



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

MARIA VITÓRIA BELLO AVOLIO

**INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DO PREPARO QUÍMICO-MECÂNICO SOB AS
BACTÉRIAS DO COMPLEXO VERMELHO E SOB OS NÍVEIS DE ENDOTOXINA, EM
CANALIS RADICULARES E BOLSAS PERIODONTAIS DE DENTES COM LESÕES
ENDO-PERIODONTAIS COMBINADAS**

PIRACICABA

2019



INVESTIGAÇÃO MICROBIOLÓGICA E DE SEUS FATORES DE VIRULÊNCIA NAS DIFERENTES PATOLOGIAS PULPARES E PERIRRADICULARES E SUA INTERAÇÃO COM O SISTEMA IMUNOLÓGICO INATO

MICROBIOLOGICAL AND VIRULENCE FACTORS INVESTIGATION IN DIFFERENT PULP AND PERIRADICULAR PATHOLOGIES AND THEIR INTERACTION WITH INNATE IMMUNE SYSTEM

PESQUISADOR: Profa. Dra. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes RESPONSÁVEL Cirurgiã Dentista, Doutora em Endodontia Professora Titular do Departamento de Odontologia Restauradora Instituição: FOP/Unicamp Avenida Limeira, 901 – Bairro Areão – Piracicaba (SP) Telefone: (19) 3412-5215 RG: M1 527102 CPF: 396.362.166-49 Email: bpgomes@fop.unicamp.br <http://lattes.cnpq.br/0590907492251966>

PESQUISADORES:

Augusto Rodrigues Lima Formação: Cirurgião-Dentista Titulação: Especialista em Endodontia Cargo: Aluno de Mestrado em Clínica Odontológica, Área de Endodontia Instituição: FOP /Unicamp Avenida Piracicamirim, 3039, Vila Monteiro, Piracicaba (SP) Telefone: (19) 98309-6747 RG: 5029946 CPF: 028.177.691-12 Email: augusto_rl@hotmail.com http://lattes.cnpq.br/7245332197107485	Priscila Amanda Francisco Formação: Cirurgiã-Dentista Cargo: Aluna de Mestrado e Clínica Odontológica, Área de Endodontia Instituição: FOP /Unicamp Rua João Pompeu Filho, 181, Jardim do Lago, Limeira (SP) Telefone: (19) 98157-5250 RG: 409851894 CPF: 350.115.518-22 Email: priscilaafrancisco@gmail.com http://lattes.cnpq.br/7771038303278079	João Carlos Leme Junior Cargo: Aluno de Graduação Instituição: FOP/Unicamp Rua Avenida Marins, 400, Bloco 49, Ap 23 – Glebas Califórnia – Piracicaba (SP) Telefone: (19) 98271-4171 RG: 42.225.143-4 CPF: 423.921.138-74 Email: joaojunior@live.com http://lattes.cnpq.br/2512051243233933
Eloá Cristina Bicego Pereira Formação: Cirurgiã-Dentista Cargo: Aluna de Mestrado em Clínica Odontológica, Área de Endodontia Instituição: FOP /Unicamp Rua Madre Cecília, 1560, Paulista, Piracicaba (SP) Telefone: (16) 98140-1221 RG:40.907.262X CPF:363.070.02840 Email: elocristina13@hotmail.com http://lattes.cnpq.br/6436200300014292	Rafaela Casadei Chapola Formação: Cirurgiã-Dentista Cargo: Aluna de Mestrado em Clínica Odontológica, Área de Endodontia Instituição: FOP/Unicamp Rua Coghi, 179, Jardim Belvedere, Araras (SP) Telefone: (19) 99183- 8578 RG: 48.403.756-0 CPF: 399.195.618-78 Email: rchapola@gmail.com http://lattes.cnpq.br/2281470277647944	Pedro Ivo da Graça Fagundes Cargo: Aluno de Graduação Instituição: FOP/Unicamp Rua: Travessa Lisboa, 61 – Jardim Europa – Bragança Paulista Telefone: (11) 97243-4186 RG: 47975300 03 CPF: 231.010.068-48 Email: pedrinhofagundes9@hotmail.com http://lattes.cnpq.br/9505280509358090
Maria Vitoria Bello Avolio Cargo: Aluna de Graduação Instituição: FOP /Unicamp Rua Bela Vista, 844 ap.151 Piracicaba (SP) Telefone: (19) 996901661 RG: 35.526.330-0 CPF: 440.518.028-84 E-mail: vitoriavolio@gmail.com http://lattes.cnpq.br/096491389703674		

PIRACICABA

SETEMBRO 2019

MARIA VITÓRIA BELLO AVOLIO

**INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DO PREPARO QUÍMICO-MECÂNICO SOB AS
BACTÉRIAS DO COMPLEXO VERMELHO E SOB OS NÍVEIS DE ENDOTOXINA, EM
CANALIS RADICULARES E BOLSAS PERIODONTAIS DE DENTES COM LESÕES
ENDO-PERIODONTAIS COMBINADAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Faculdade de Odontologia de Piracicaba da
Universidade Estadual de Campinas como parte dos
requisitos exigidos para obtenção do título de Cirurgião
Dentista.

Orientadora: Prof^a Dr^a Brenda Paula F. A. Gomes

Coorientadora: Rafaela Casadei Chapola

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DO TRABALHO DE
CONCLUSÃO DE CURSO APRESENTADO
PELO(A) ALUNO(A) Maria Vitoria Bello
Avolio E ORIENTADO(A) PELO(A)
PROF(A). DR(A). Brenda Paula F. A. Gomes

PIRACICABA

2019

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Marilene Girello - CRB 8/6159

Av73i Avolio, Maria Vitória Bello, 1994-
Investigação do efeito do preparo químico-mecânico sob as bactérias do complexo vermelho e sob os níveis de endotoxina, em canais radiculares e bolsas periodontais de dentes com lesões endo-periodontais combinadas / Maria Vitória Bello Avolio. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes.

Coorientador: Rafaela Casadei Chapola.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Endotoxinas. 2. Canal radicular. 3. Bolsa periodontal. I. Gomes, Brenda Paula Figueiredo de Almeida. II. Chapola, Rafaela Casadei, 1992-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

Informações adicionais, complementares

Palavras-chave em inglês:

Endotoxins

Root canal

Periodontal pocket

Titulação: Cirurgião-Dentista

Data de entrega do trabalho definitivo: 01-10-2019

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos que estiveram comigo nessa caminhada.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, nas pessoas do diretor Prof. Dr. Francisco Haiter Neto e do diretor associado Prof. Dr. Flávio Henrique Baggio Aguiar.

À minha família, especialmente meus pais Luiz Francisco Torquato Avolio e Isabella Maria Bello Avolio, pelo apoio incondicional.

Agradeço ao meu cunhado Marco Cicero Bottino pela minha introdução na odontologia, por todos os conselhos, pelo despertar da minha curiosidade científica e por tudo.

À Prof. Dra. Brenda Paula F. A. Gomes pela oportunidade de realizar a iniciação científica na área de endodontia da FOP, por toda ajuda e orientação.

Ao Prof. Dr. Américo Bortolazzo Correr, por me dar a chance de realizar minha primeira iniciação científica, na área de Materiais Dentários, e por todo conhecimento adquirido.

À professora Marina Angélica Marciano da Silva por toda ajuda e paciência durante a clínica, desde minha primeira endodontia.

À pós graduanda Rafaela Casadei Chapola por toda amizade, ajuda durante a graduação, pela orientação na iniciação científica e na vida.

À pós graduanda Cinthya Arias Guillen, por me ajudar a vencer minhas barreiras com a odontopediatria. Por toda paciência, ajuda e ensinamentos.

A meus amigos, em especial Luana de Antonis Pitton, Marcela Takemoto Kim, Gabriela Gama, Isabele Vieira, Daniel Chan, Vitoria Sorente, Luis Fernando Candido, Maria Julia Valentini, Beatriz Martins, Beatriz Hidalgo e Mariana Fabbro; por todos os momentos, por compartilhar lágrimas de desespero e alegria.

A tantas outras pessoas que convivi durante meus cinco anos na FOP, não tenho palavras suficientes para descrever... apenas o meu muito obrigada.

RESUMO

Polpa e o periodonto possuem entre si uma íntima relação anatômica e funcional, devido à formação embriológica simultânea dessas estruturas. As vias de comunicação entre ambas as estruturas podem justificar a influência infecciosa e inflamatória que um tecido tem sobre o outro. Lesões endo-periodontais combinadas (LEPC) são resultado de processos patológicos, que afetam tanto o tecido pulpar quanto o periodontal, de forma independente, num mesmo elemento dental. O Complexo Vermelho é um consórcio bacteriano formado por três microrganismos anaeróbios Gram-negativos (*Porphyromonas gingivalis* - Pg, *Treponema denticola* - Td, e *Tannerella forsythia* - Tf), altamente associado à severidade da doença periodontal. As bactérias Gram-negativas apresentam o lipopolissacarídeo (LPS) como seu fator de virulência mais relevante, presente na membrana externa desses microrganismos, responsável pelos principais fenômenos inflamatórios que ocorrem nas patologias pulpares e periodontais. Diante do exposto, este estudo teve como propostas: pesquisar a presença das espécies do Complexo Vermelho nas bolsas periodontais (BP's) e nos canais radiculares (CR's) em dentes portadores de LEPC, pelo método de Nested-PCR; analisar a eficácia do preparo químico-mecânico (PQM) em alterar essa carga microbiana em ambos os sítios; e analisar o efeito do PQM na redução dos níveis de LPS, nos CR's e nas BP's. Para isso, foram utilizadas 10 amostras clínicas coletadas dos CR's e das BP's, antes e após o PQM. Foi realizada a extração do DNA bacteriano dessas amostras e o mesmo foi analisado microbiologicamente, por meio do Nested-PCR, utilizando-se primers espécies-específicos para Td, Pg, e Tf. A quantificação dos níveis endotóxicos foi realizada através do LAL (Lisado de Amebócito Limulus), teste turbidimétrico quantitativo. Os resultados revelaram que o microrganismo mais frequentemente encontrado nos CR's, antes do PQM foi Td (100%, 10/10), Pg esteve presente em 40% dos casos (4/10) e Tf em 20%. Após o PQM, o mais frequente foi Tf (50%, 5/10), Td e Pg estiveram presentes em 40% (4/10) dos casos. Na bolsa, inicialmente ao PQM a espécie mais prevalente foi Td (100%, 10/10), seguido de Tf (70%, 7/10) e Pg (40%, 4/10). Após o PQM, Td esteve presente em 90% dos casos (9/10), Tf e Pg foram encontrados em 50% dos casos analisados (5/10). Com relação à quantificação de LPS, a média de encontrada nas coletas iniciais dos CR's foi de 18,92 EU/mL. Após o PQM, foi de 0,22 EU/mL. Nas BP's, inicialmente ao PQM, o valor médio foi de 184,63 EU/mL. Após o mesmo, foi encontrada uma média de 89,37 EU/mL. Concluiu-se que Td foi a espécie do Complexo Vermelho mais prevalente nas BP's tanto antes, quanto após o PQM. O PQM foi capaz de alterar a carga microbiana em ambos os sítios; houve redução das endotoxinas, após o PQM, nos CR's e nas BP's dos dentes com LEPC.

Palavras-chave: Endotoxinas. Canal radicular. Bolsa periodontal.

ABSTRACT

The pulp and periodontal tissues have a close anatomical and functional relationship due to the simultaneous embryological formation of these structures. The communication pathways between both structures may justify the infectious and inflammatory influence that one tissue has on the other. Combined endo-periodontal lesions (CEPL) are the result of pathological processes that affect both pulpal and periodontal tissues independently in the same dental element. The Red Complex is a bacterial consortium formed by three Gram-negative anaerobic microorganisms (*Treponema denticola* - Td, *Porphyromonas gingivalis* - Pg and *Tannerella forsythia* - Tf), highly associated with the severity of periodontal disease. The main virulence factor of gram-negative bacteria is lipopolysaccharide (LPS), present in the outer membrane of these microorganisms, responsible for the main inflammatory phenomenon that occur in pulpal and periodontal pathologies. Given the above, the objectives of this study were: to investigate the presence of Red Complex species in root canals (RC's) and periodontal pockets (PP's) of teeth with CEPL, by the Nested-PCR method; verify the ability of the chemical-mechanical preparation (CMP) to change this microbial load at both sites; and to analyze the effect of CMP on the reduction of LPS levels, RC's and PP's. For this, 10 clinical samples were collected from RC's and PP's, before and after the CMP. Bacterial DNA from these samples was extracted and microbiologically analyzed by Nested PCR using species-specific primers for Td, Pg, and Tf. The quantification of endotoxin levels was performed by the Limulus Amebocyte Lysate (LAL) test. The results showed that the most frequent microorganism found in RC's before the CMP was Td (100%, 10/10), Pg was present in 40% of cases (4/10) and Tf in 20%. After CMP, the most frequent was Tf (50%, 5/10), Td and Pg were present in 40% (4/10) of the cases. In the pockets, initially to CMP the most prevalent species was Td (100%, 10/10), followed by Tf (70%, 7/10) and Pg (40%, 4/10). After CMP, Td was present in 90% of cases (9/10), Tf and Pg were found in 50% of cases analyzed (5/10). Regarding the quantification of LPS, the average found in the initial collections of RC's was 18.92 EU/ mL. After the CMP, it was 0.22 EU/ mL. In PP's, initially to the CMP, the average value was 184.63 EU/ mL. After that, an average of 89.37 EU/ mL was found. It was concluded that Td was the most prevalent Red Complex species in both PP's and RC's before and after the CMP. The CMP was able to alter the microbial load at both sites. There was a reduction in endotoxins after the CMP, in the RC's and PP's of the teeth with LEPC.

Key words: Endotoxins. Root canal. Periodontal pocket.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1 Inter-relação endodôntica-periodontal	14
2.2 Comunicações fisiológicas	14
2.2.1 Forame apical	14
2.2.2 Canais laterais, acessórios e secundários	15
2.2.3 Túbulos dentinários	15
2.2.4 Sulcos de desenvolvimento	16
2.3 Comunicações não-fisiológicas	17
2.3.1 Perfurações radiculares	17
2.3.2 Fraturas verticais	17
2.4 Infecção pulpar como causa da lesão periodontal	17
2.5 Doença periodontal como causa da infecção pulpar	17
2.6 Classificação das lesões endodônticas-periodontais	18
2.7 Complexo Vermelho e doença periodontal	19

2.8 Complexo Vermelho e infecção endodôntica	20
2.9 Complexo Vermelho e lesões endo-periodontais combinadas	21
2.10 Endotoxinas	22
2.11 Importância do preparo químico-mecânico (PQM) na diminuição do conteúdo microbiológico e endotóxico nas bolsas periodontais e canais radiculares	23
3 PROPOSIÇÃO	24
4 MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1 Seleção das amostras	25
4.2 Coletas e procedimentos clínicos	25
4.3 Coletas clínicas nas bolsas periodontais	25
4.4 Coletas clínicas no canal radicular e procedimentos endodônticos	26
4.5 Procedimentos endodônticos	27
4.6 Técnicas moleculares	28
4.7 Quantificação de Endotoxinas	30
5 RESULTADOS	33
5.1 Nested- PCR	33
5.1.1 Canal Radicular	33

5.1.2 Bolsa Periodontal	33
5.2 Quantificação de endotoxinas	34
5.2.1 Canal Radicular	34
5.2.2 Bolsa Periodontal	34
6 DISCUSSÃO	35
6.1 Nested- PCR	35
6.2 Endotoxinas	36
7 CONCLUSÃO	37
REFERÊNCIAS	38
ANEXOS	42
Anexo 1 – Verificação de originalidade e prevenção de plágio	42
Anexo 2 – Comitê de Ética em Pesquisa	43

1 INTRODUÇÃO

A relação entre polpa e periodonto é entendida como embriológica, anatômica e funcional (Chacker, 1974; Christie e Holthuis, 1990). Devido à embriogênese desses tecidos ocorrer concomitantemente, são formadas diversas vias de comunicação entre eles, como: túbulos dentinários, forame apical, canais secundários/laterais/acessórios (Gomes et al., 1996a; Rotstein e Simon, 2004). Essas vias de comunicação permitem a troca de agentes nocivos e demonstram o efeito que um possui sobre o outro, sendo, pois, um importante fator na etiopatogenia das lesões endo-periodontais combinadas (necrose pulpar e doença periodontal) (Sunitha et al., 2008).

A literatura relata fortes relações entre canais radiculares infectados e doença periodontal, acometendo um mesmo elemento dental (Kipioti et al., 1984; Kobayashi et al., 1990; Pereira et al., 2011; Gomes et al., 2015). Entretanto, poucos são os estudos que comprovam a similaridade entre endodôntica-periodontal. Além disso, a literatura ainda é escassa quanto aos efeitos do tratamento endodôntico sob os microrganismos e seus fatores de virulência nas bolsas periodontais e canais radiculares, nos dentes com lesões endodônticas-periodontais combinadas.

A instrumentação mecânica dos canais radiculares, pelos instrumentos utilizados na Endodontia, não é capaz de descontaminar completamente algumas áreas, devido à anatomia complexa do sistema de canais radiculares (Byström et al., 1985; Gomes et al., 1996a). Portanto, a máxima diminuição de patógenos e de seus fatores de virulência é obtida, através da utilização de substâncias químicas auxiliares, como a clorexidina, que tem se destacado devido à sua ampla capacidade de ação antimicrobiana, substantividade e baixa citotoxicidade (Ferraz et al. 2001, Gomes et al., 2001, Vivacqua Gomes et al., 2002; Vianna et al., 2004; Gomes et al., 2005; Ferraz et al., 2007; Oliveira, 2013).

O Complexo Vermelho é constituído por um grupo de bactérias Gram-negativas anaeróbias estritas (*Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*), altamente relacionadas à gravidade das patologias periodontais (Socransky et al., 1998). Por isso, a grande importância em estudar esse consórcio bacteriano nas bolsas periodontais e canais radiculares, em dentes com LEPC, além de verificar a vulnerabilidade dessas bactérias, em ambos os sítios, aos procedimentos biomecânicos de desinfecção do canal radicular.

A notória vantagem dos métodos, baseados nos princípios da biologia molecular, é o reconhecimento de bactérias anaeróbias, de árduo cultivo, como as que compõem o Complexo Vermelho (Willis et al., 1999; Gomes e Montagner, 2010). Dentre as técnicas moleculares existentes, podemos destacar o Nested-PCR. Nesta modalidade de PCR, o ensaio laboratorial é realizado em duas etapas, consecutivamente. A primeira reação é feita com primers universais, em

que o gene bacteriano 16S rRNA é amplificado, posteriormente à extração do DNA das amostras. Após, é executada uma segunda reação de amplificação, através dos primers espécies-específicos, que irão se anelar internamente à uma sequência de nucleotídeos específica, no primeiro fragmento, gerado pela reação universal, conferindo à técnica de Nested-PCR especificidade e sensibilidade superiores às aquelas obtidas em PCR simples (Willis et al., 1999; Gomes e Montagner, 2010).

Dentre os fatores de virulência bacteriana, o lipopolissacarídeo (LPS), também denominada endotoxina, faz parte da estrutura da membrana externa, da parede celular, de espécies bacterianas Gram-negativas. O potencial patogênico, das referidas bactérias, está relacionado com a presença desse importante fator de virulência, em processos inflamatórios que acometem a polpa e os tecidos periapicais.

Sendo assim, esse estudo teve como proposta investigar a capacidade do PQM sob as bactérias do Complexo Vermelho e sob o conteúdo endotóxico, nas bolsas periodontais e nos canais radiculares, de dentes com bolsas periodontais profundas e necrose da polpa, para fins de estabelecimento de um protocolo efetivo de tratamento.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Inter-relação endodôntica-periodontal

A relação entre os tecidos pulpar e periodontal pode ser entendida como embriológica, anatômica e funcional. Ambos têm origem nas células ectomesenquimais, presentes no germe dentário. Tais células se proliferam, resultando na formação da papila e folículo dentário, que são os precursores da polpa e do aparato periodontal (ligamento periodontal, osso alveolar e cimento radicular), respectivamente (Singh, 2011).

Devido à formação embriológica simultânea, a polpa e o periodonto possuem diversas vias de comunicação anatômica entre si: forame apical, túbulos dentinários, canais laterais e acessórios, sulcos de desenvolvimento, delta apical, canais reticulares, anastomoses e anacorese (Zaruba et. al., 2016). Essas vias estão altamente relacionadas com a etiopatogenia das lesões endo-periodontais e justificam a atuação de um tecido sob o outro (Al et. al., 2017).

São importantes, ainda, as comunicações não-fisiológicas, como as provocadas por iatrogenias indesejáveis, durante o tratamento endodôntico, ou pelas fraturas dentais (Rotstein et. al., 2000; Zehnder et. al., 2002).

2.2 Comunicações fisiológicas

2.2.1 Forame apical

O fechamento do ápice do dente e, conseqüentemente, da formação do forame apical, ocorre com a proliferação da bainha de Hertwig. O forame é o caminho principal entre os tecidos pulpar e periodontal e serve de passagem às estruturas de nutrição e inervação da polpa (Zehnder et. al., 2002; Singh, 2011).

Subprodutos provenientes do processo infeccioso e inflamatório de uma polpa necrosada podem atingir os tecidos perirradiculares, através do forame apical, que pode funcionar também como via de acesso do aparato periodontal comprometido para o tecido pulpar. Nesses casos, a necrose pulpar só ocorrerá se houver o envolvimento do forame apical, ou seja, quando o biofilme subgingival proveniente da bolsa periodontal comprometer a região mais apical da superfície da raiz, comprometendo, assim o suprimento vascular para o interior do canal radicular (Singh, 2011).

Outras ramificações, que partem do canal principal em direção ao ligamento periodontal, podem ser caminhos potenciais, que justificam a reciprocidade infecciosa e inflamatória entre a polpa e periodonto, como os canais laterais, acessórios, secundários e túbulos dentinários (Zehnder et. al., 2002).

2.2.2 Canais laterais, acessórios e secundários:

A incorporação de vasos sanguíneos, provenientes do periodonto, durante a rizogênese, acarreta na formação desses canais, uma vez que esses vasos interrompem a proliferação descendente da BEH (bainha epitelial de Hertwig), e ocorre a formação de dentina ao redor dos mesmo (Singh, 2011). Eles são mais freqüentes no terço apical da raiz e na região de furca (Rotstein et. Al., 2000; Zehnder et. al, 2002). Anatomicamente, os canais laterais e secundários localizam-se nas porções mais coronária e apical da superfície radicular, respectivamente. Os canais acessórios são ramificações dos canais secundários, em direção à superfície periférica do dente (Rubach e Mitchell, 1965; Kirkham, 1975).

De Deus, em 1992, realizou um estudo que teve o objetivo de averiguar a presença, direção e localização dos canais laterais, acessórios e secundários, nos diferentes terços radiculares. Os resultados mostraram que os mesmos foram mais frequentes na região apical e de bifurcação e trifurcação dos dentes posteriores (molares e pré-molares).

O canal cavo-inter-radicular tem origem no assoalho da câmara pulpar, até o espaço do ligamento periodontal, na região de furca, tendo grande potencial de agir como uma via de contaminação entre polpa e periodonto, em dentes multirradiculares (Seltzer et al., 1967).

Shambarger et al., 2015 desenvolveram um estudo, onde analisaram se a raspagem radicular, na região de furca, em molares, poderia resultar na contaminação do tecido pulpar, concluindo que o tratamento periodontal, nessa região, pode aumentar o risco de contaminação bacteriana da polpa em até 39%.

2.2.3 Túbulos dentinários:

Os túbulos dentinários contêm o processo odontoblástico, que se estende da polpa até a junção amelo-dentinária e amelo-cementária (Sunitha et. al, 2008). Em um dente maduro, cada túbulo dentinários pode ser considerado como um cone invertido com a menor dimensão na periferia e a maior dimensão próximo à polpa. A abertura de cada um desses pequenos túneis, voltados para o ligamento periodontal, é selado com cimento (Zehnder et. al, 2002).

Embora a dentina seja uma barreira física, que protege o tecido pulpar dos agentes agressores externos, justificada pela porção mineralizada presente em sua constituição, a mesma possui uma estrutura tubular, permitindo com que bactérias e seus subprodutos, advindos do biofilme subgengival, sejam capazes de se propagar através dele, e afetar o tecido pulpar. Da mesma forma, os microrganismos e seus subprodutos tóxicos, envolvidos na infecção pulpar, podem atingir os tecidos periodontais, através dos túbulos dentinários patentes (Walton e Torabinejad, 1997).

Foi encontrado que, próximo à junção dentino-pulpar, a quantidade de túbulos dentinários é de aproximadamente 45000 unidades/mm², que corresponde a 22% da superfície da junção. Entretanto, à medida que se analisa uma dentina mais periférica, a quantidade dos túbulos passa a ocupar 1% da área total (15000 unidades/mm²) (Lopes e Siqueira Jr, 1999). Na dentina radicular, os túbulos dentinários são mais numerosos no terço cervical (44.243 túbulos/mm²), seguido do terço médio (42.360 túbulos/mm²) e apical (8.190 túbulos/mm²) (Carrigan et al., 1984).

A presença de cimento intacto na superfície da raiz possui extrema relevância, uma vez que protege a polpa dos estímulos nocivos, originados do biofilme aderido à superfície radicular. Contudo, uma vez ocorrido a quebra da integridade dessa camada, através de procedimentos periodontais rotineiros, haverá a exposição dos túbulos, que poderão servir como porta de entrada para a invasão bacteriana (Grudianov et al., 2013).

Nagaoka et al., 1995 constataram que os mesmos, quando estão relacionados a uma polpa que está vital, tem sua contaminação bacteriana dificultada, podendo, até mesmo, retardar essa invasão, uma vez que prolongamentos odontoblásticos, presença do fluido dentinário e fibras colágenas são capazes de influenciar negativamente essa progressão. Contrariamente, a invasão é facilitada em polpas necróticas e nos dentes endodonticamente tratados.

2.2.4 Sulcos de desenvolvimento

Esses sulcos estão na categoria de malformações de desenvolvimento dentário e geralmente acometem incisivos centrais e laterais superiores, cruzando o cingulo e seguindo, apicalmente, até atingir a superfície da raiz. Esses sulcos interferem na condição periodontal do dente, já que favorecem o acúmulo de biofilme, contaminação bacteriana e início da doença periodontal (Rotstein et. al, 2000). A polpa também pode sofrer efeitos nocivos do acúmulo de microrganismos nessa região. A presença de bolsa periodontal, resultado do acúmulo de biofilme na superfície radicular, nos sulcos palato radiculares, é de difícil diagnóstico, na maioria das situações clínicas (Rotstein e Simon, 2004).

2.3 Comunicações não-fisiológicas

2.3.1 Perfurações radiculares

As perfurações radiculares são complicações clínicas indesejáveis, que podem levar à falha do tratamento, uma vez que é criada uma via de comunicação entre polpa e periodonto. São resultado da própria instrumentação mecânica, durante o tratamento endodôntico. Além disso, as reabsorções, sejam elas internas ou externa, e presença de cáries comunicantes com a câmara pulpar, também são possíveis causas das perfurações (Rotstein et. al, 2000).

2.3.2 Fraturas verticais

As fraturas verticais, causadas, principalmente, pelo trauma dental, também são vias de contaminação importante entre os tecidos pulpar e periodontal (Rotstein e Simon, 2004).

2.4 Infecção pulpar como causa da lesão periodontal

A literatura indica largamente que a maioria das patologias pulpares e periodontais têm etiologia bacteriana. Sob quais condições e qual direção a propagação da doença ocorre continua sendo uma questão de controvérsia. O fato é que a literatura científica é bastante concisa, no que concerne à existência de semelhanças entre a microbiota encontrada em bolsas periodontais e canais radiculares infectados, em dentes com comprometimento periodontal (Zehnder et. al, 2002; Sunitha et. al, 2008; Zaruba et. al, 2016).

A infecção pulpar pode provocar uma resposta inflamatória no periodonto adjacente, uma vez que os subprodutos infecciosos, oriundos dessa polpa, podem infiltrar-se pelas diversas vias anatômicas, entre ambos os sítios, e iniciar a resposta inflamatória no tecido periodontal. As implicações clínicas, desse processo, podem ser desde uma mínima inflamação, confinada ao espaço do ligamento periodontal, até uma lesão extensa, envolvendo todo o aparato de inserção do elemento dental em questão. Além disso, edemas localizados ou difusos e presença de fístula são alguns dos sinais clínicos característicos em tais lesões. O restabelecimento da saúde periodontal ocorrerá após o tratamento endodôntico adequado (Walton e Torabinejad, 1997).

2.5 Doença periodontal como causa da infecção pulpar

O efeito das lesões periodontais na polpa, por sua vez, pode resultar em alterações atróficas e outras alterações degenerativas, como redução do número de células pulpares, distrofia, mineralização, fibrose, formação reparadora de dentina, inflamação e reabsorção. Nas situações em que a doença periodontal progride mais lentamente, a deposição fisiológica do cimento, na superfície radicular, pode atuar para obliterar os canais laterais antes que ocorra irritação pulpar.

Isso pode explicar o motivo pelo qual nem todos os dentes, comprometidos periodontalmente, apresentem atrofia pulpar e atresia de canal radicular (Sunitha et. al., 2008).

A repercussão da infecção periodontal na polpa dentária é questionável e existem muitos estudos conflitantes. Foi sugerido que a doença periodontal não tem efeito na polpa antes de envolver o ápice. Por outro lado, diversos estudos sugeriram que a implicação da doença periodontal no tecido pulpar é de natureza degenerativa, incluindo um aumento de sequelas inflamatórias, além de fibrose, calcificações, fibrose e reabsorção de colágeno (Singh, 2011).

2.6 Classificação das lesões endodônticas-periodontais

A relação endodôntica-periodontal foi descrita, pela primeira vez, por Simring e Goldberg em 1964. Desde então, o termo lesão endo-perio; tem sido usado para descrever os processos inflamatórios, que ocorrem em graus variados, em ambos os sítios, num mesmo elemento dental (Singh, 2011).

Essas lesões podem ser de origem endodôntica, periodontal, ou serem o resultado de dois processos diferentes e independentes, caracterizando as lesões combinadas. Diferentes autores criaram classificações variadas para essas patologias, com base em critérios etiológicos ou clínicos, ou na combinação destes (Zehnder et. al, 2002).

A classificação de Torabinejad e Trope, feita em 1996 tem como base o melhor tratamento para essas lesões:

- 1) Lesões de origem endodôntica;
- 2) Lesões de origem periodontal;
- 3) Lesões endo-periodontais combinadas;
- 4) Lesões com comunicações;
- 5) Lesões sem comunicações.

Armitage, em 1999, dividiu as lesões em apenas três grupos:

- 1) Lesões endo-periodontais;
- 2) Lesões perio-endodônticas;
- 3) Lesões combinadas.

Porém, a classificação mais utilizada é a de Simon et. al em 1972. E é baseada na sua causa primária, diagnóstico, prognóstico e tratamento:

- ☐ Lesões endodônticas primárias
- ☐ Lesões periodontais primárias
- ☐ Lesões endodônticas primárias com envolvimento periodontal secundário
- ☐ Lesões periodontais primárias com envolvimento endodôntico secundário
- ☐ Lesões endo-perio combinadas verdadeiras

Mais recentemente, foi sugerida uma nova classificação, com base na doença primária com efeito secundário, pois no primeiro item da classificação proposta por Simon e colaboradores em 1972: “lesões endodônticas primárias”, não foi feito um paralelo com a patologia periodontal (Zehnder et. al, 2002). Assim, essa classificação se desenvolve da seguinte maneira:

- (1) doença periodontal retrógrada:
 - a) lesão endodôntica primária com drenagem pelo do ligamento periodontal,
 - (b) lesão endodôntica primária com envolvimento periodontal secundário;
- (2) lesão periodontal primária;
- (3) lesão periodontal primária com envolvimento endodôntico secundário;
- (4) lesão endo-periodontal combinada;
- (5) lesões periodontais iatrogênicas.

2.7 Complexo Vermelho e doença periodontal

O processo inflamatório nos tecidos periodontais mais profundos associa-se ao biofilme subgengival, composto por espécies bacterianas altamente patogênicas. Socransky et al., 1998 agrupou essas bactérias em cinco diferentes Complexos, sendo o Complexo Vermelho, composto por *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia* e *Porphyromonas gingivalis*, que são espécies anaeróbias Gram-negativas, o mais associado com as características clínicas da doença periodontal, particularmente com a presença de bolsas periodontais profundas e sangramento à sondagem (Ng et al., 2016; Tsai et al., 2016).

Quando em interação sinérgica, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia* e *Porphyromonas gingivalis*, considerados potentes periodontopatógenos, passam a ser espécies ainda mais virulentas (Ng et al., 2016; Tsai et al., 2016).

Teles et al., 2010, quantificaram os níveis de biomarcadores da doença periodontal e analisaram a microbiota subgengival, no fluido crevicular gengival, em indivíduos periodontalmente saudáveis, e periodontalmente comprometidos, afim de relacionar entre esses biomarcadores com a microbiota subgengival e os parâmetros clínicos da doença periodontal. Os resultados revelaram que as espécies do Complexo Vermelho foram altamente associadas com a expressão de todos os biomarcadores estudados, envolvidos na destruição do aparato de inserção dos dentes.

Al-Hebsh et al., 2014, analisando a microbiota subgengival em pacientes portadores da periodontite crônica, concluíram que *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola* foram as mais associadas com a destruição do aparato periodontal.

Em um estudo de Lanza et al., em 2016, os autores tiveram como objetivo associar as espécies do Complexo Vermelho com os sinais clínicos da periodontite crônica. Eles concluíram que *Tannerella forsythia* foi a bactéria mais associada à severidade da doença e *Treponema denticola* foi a mais relacionada com o sangramento à sondagem.

Sabendo-se que as bactérias presentes no biofilme subgengival são as principais causadoras das periodontites (Socransky et al., 1998), e que a maioria dessas espécies são muito seletivas com relação aos requerimentos nutricionais e gasosos, a identificação das mesmas, pelas técnicas tradicionais de cultivo microbiológico, passa a ser inviável. Com a finalidade de superar esse obstáculo, os métodos moleculares, sustentados pela amplificação e sequenciamento do DNA bacteriano, tem o objetivo de realizar a identificação de diversas espécies bacterianas em uma única amostra (Paster et al., 2006).

2.8 Complexo Vermelho e infecção endodôntica

O interior dos canais radiculares fornece condições ecologicamente seletivas aos microrganismos, envolvidos na infecção endodôntica, devido à escassez de nutrientes, baixo potencial de oxido-redução e pH (Sundqvist e Figdor, 2003; Sundqvist, 1994; Fabricius et al., 1982). Inicialmente, a microbiota que prevalece no canal radicular infectado, é composta, predominantemente, por anaeróbios facultativos, que utilizam os carboidratos presentes no meio para exercerem suas atividades metabólicas (Fabricius et al., 1982, Sundqvist, 1994, Figdor e Sundqvist, 2007; Sundqvist e Figdor, 2003).

Com o avanço dessa infecção em direção apical, as condições ambientais ficam ainda mais desfavoráveis, o que favorece o predomínio dos microrganismos anaeróbios estritos, que utilizam os substratos metabólico do próprio tecido pulpar, em processo de necrose (proteínas e glicoproteínas) (Fabricius et al., 1982, Sundqvist, 1994, Figdor e Sundqvist, 2007; Sundqvist e Figdor, 2003).

As bactérias do Complexo Vermelho estão entre os microrganismos mais encontrados no terço apical dos canais radiculares infectados, profundamente relacionadas com o desenvolvimento de abscessos e lesões do periápice. A identificação desse consórcio bacteriano, no contexto das infecções endodônticas, só ocorreu após o advento das técnicas que se baseiam nos princípios da biologia molecular. Portanto, o surgimento dessas metodologias, que envolvem a análise do gene bacteriano 16SrRNA, permitiu a identificação de importantes periodontopatógenos que podem também estar presentes nas patologias pulpares (Baumgartner *et al.*, 2003; Sundqvist e Figdor, 2003; Siqueira e Rocas, 2004; Foschi *et al.*, 2005; Siqueira e Rôças, 2005; Figdor e Sundqvist, 2007).

2.9 Complexo Vermelho e lesões endo-periodontais combinadas

Berber, em 2006, analisaram a microbiota nas bolsas periodontais e canais radiculares, em 40 dentes, com lesões endo-perio combinadas, por meio do PCR convencional. Antes do PQM, nas bolsas periodontais, *P.gingivalis* foi encontrada em 62,5% dos casos, *T.denticola* em 75% e *T.forsythia* em 52,5%, porém, após o PQM, apenas *P.gingivalis* foi detectada com uma menor frequência (57,5%). Nos canais radiculares, inicialmente ao PQM, *P.gingivalis* esteve presente em 37,5% dos casos, *T.denticola* em 57,5% e *T.forsythia* em 32,5%. Após o PQM, nos CR's, *T.denticola* e *T.forsythia* apresentaram redução estatisticamente significativas (22,5% e 5%, respectivamente).

Gomes et al., 2015, pesquisaram a carga microbiana no interior de bolsas periodontais e canais radiculares, de 15 pacientes com necessidade de tratamento endodôntico, devido à presença de lesões endo-periodontais combinadas, através da técnica de sequenciamento genético. Nas bolsas periodontais, tanto antes quanto após o PQM, a espécie bacteriana do Complexo Vermelho mais frequentemente detectada foi *Tannerella forsythia*, porém. Nos canais radiculares, inicialmente ao PQM, *T.forsythia* também foi a mais prevalente, porém, após a terapia endodôntica, *P.gingivalis* foi a mais frequentemente encontrada.

Chapola, 2017, analisou, através do Nested-PCR, 14 bolsas periodontais e 14 canais radiculares, de dentes que apresentavam lesões endo-perio combinadas, antes e após os procedimentos endodônticos de descontaminação do sistema de canais radiculares. As coletas iniciais das bolsas periodontais demonstraram que *T.denticola* foi a mais prevalente (92,9%), e que o PQM foi capaz de reduzir a frequência de *T.forsythia* (BP1 78,6%; BP2 71,4%) e *T.denticola* (BP1 92,9%; BP2 71,4%), porém, *P.gingivalis* foi encontrada em 50% dos BP1 e 71,4% em BP2. Nos canais, antes do PQM, *T.denticola* também foi a mais prevalente (50%), porém o PQM foi capaz de reduzir significativamente essa frequência (21,4%); *T.forsythia* foi detectada em 21,4% em CR1 e 42,9% em CR2, já *P.gingivalis*, foi encontrada em 21,4% dos casos em CR1 e 28,6% dos casos em CR2.

2.10 Endotoxinas

No âmbito das patologias pulpares e periodontais, as bactérias Gram-negativas possuem uma grande relevância, devido ao fato de apresentarem o LPS (lipopolissacarídeos) na membrana externa de sua parede celular, mais conhecido como endotoxinas (Gomes et al., 2009).

Uma vez liberada da célula bacteriana, por lise ou divisão celular, a molécula é capaz de desencadear uma cascata de eventos, que resultam em um intenso processo inflamatória e reabsorção dos tecidos ósseos (Khabbaz et al., 2001; Beutler, 2004).

O LPS possui a importante habilidade de alcançar uma profundidade nos túbulos dentinários 4 vezes mais do que própria bactéria (Berkiten et al., 2000; Gomes et al., 2009). São quimicamente constituídos por três porções: Lípideo A, Core (polissacarídeo) e Antígeno O, sendo que o Lipídeo A é o maior responsável pelos eventos endotóxicos (Dixon e Darveau, 2005).

Estudos clínicos prévios já demonstraram a presença, em 100% dos casos, desse distinto fator de virulência, em canais radiculares de dentes necrosados com lesão periapical associada (Martinho e Gomes, 2008; Gomes et al., 2009; Martinho et al., 2010; 2011).

Conforme alguns estudos já demonstraram, o LPS se adere fraca e superficialmente na superfície radicular, removido, facilmente, por procedimentos de raspagem e alisamento radicular. Porém, esses procedimentos ainda podem ser insuficientes, sendo necessário utilizar alguma substância química, a fim de maximizar a redução desses níveis, uma vez que a reação inflamatória, desencadeada pela presença de LPS, pode resultar em grande destruição do aparato de inserção periodontal (Nakib et al., 1982; Nyman et al., 1988; Minabe et al., 1994 Lowenguth e Greenstein, 1995; Duque, 2016).

2.11 Importância do preparo químico-mecânico (PQM) na diminuição do conteúdo microbiológico e endotóxico nas bolsas periodontais e canais radiculares

A abordagem terapêutica inicial, para os dentes diagnosticados com lesões endo-periodontais combinadas, é o tratamento endodôntico (Adriaens et al., 1988), que tem como principal objetivo, a máxima redução do conteúdo infeccioso e inflamatório do sistema dos canais, por meio da cinética dos instrumentos endodônticos e de substâncias químicas auxiliares com ampla capacidade antimicrobiana antimicrobiana (Safavi e Nichols, 1993).

Byström e Sundqvist 1981 demonstraram que apenas a instrumentação mecânica, utilizando a solução salina como irrigante, é capaz de reduzir a quantidade de bactérias drasticamente. Porém, as complexidades anatômicas, presentes em todo o sistema de canais radiculares, inviabilizam a complexa desinfecção deles, pela ação mecânica dos instrumentos. Para esse fim, é imperioso o uso de substâncias químicas auxiliares, durante o PQM.

A utilização da clorexidina gel 2% tem sido evidenciada, na Endodontia, por meio de seu espectro de ação antimicrobiano abrangente, baixa citotoxicidade, capacidade de lubrificação das paredes do canal e neutralização componentes da parede celular bacteriana, como o LPS, além de permitir que as partículas de detritos, produzidos durante o preparo mecânico, fiquem em suspensão no lúmen do canal. Sendo uma molécula catiônica, a clorexidina tem a capacidade de se ligar a hidroxiapatita do esmalte ou dentina, o que significa que ela é liberada lentamente à medida que sua concentração no meio diminui, o que garante à ela a característica de substantividade (Ferraz et al., 2001, 2007; Zorko e Jarela, 2008; Gomes et al., 2013).

3 PROPOSIÇÃO

- a) Investigar a presença de *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* e *Tannerella forsythia* em bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com doença periodontal e necrose pulpar (caracterizando lesão endo-perio combinada), pelo método de Nested-PCR;
- b) Verificar a capacidade do preparo químico-mecânico em eliminar os microrganismos investigados;
- c) Estudar o efeito do PQM (preparo químico mecânico) na diminuição dos níveis de endotoxinas, na bolsa periodontal e no canal radicular associado.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Seleção das amostras:

Neste estudo, utilizaram-se coletas clínicas, armazenadas numa temperatura de -80°C, do Banco de Coletas do Laboratório de Microbiologia aplicada à Endodontia, da FOP-UNICAMP. Essas coletas foram executadas de acordo com Chapola (2017) e aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa dessa mesma instituição (protocolo nº 119/2015-ANEXO I).

Amostras de dentes necrosados, com lesão radiolúcida no periápice e presença de sondagem periodontal maior ou igual a 6 mm, em mais de uma face dental, foram analisadas neste trabalho. Pacientes com patologias sistêmicas foram eliminados. Indivíduos que passaram pela terapia periodontal, um ano precedentemente às coletas clínicas, e que administraram antibiótico sistêmico e/ou local, 3 meses antes das mesmas foram também excluídos. Dentes abertos, com cárie próxima à polpa, presença de trincas, calcificações, reabsorção externa foram outros critérios de exclusão desta pesquisa.

4.2 Coletas e procedimentos clínicos:

O atendimento clínico dos pacientes, participantes do estudo, foi realizado na Clínica de Especialização, da Fop-Unicamp, e as amostras foram analisadas no Laboratório de Endodontia, desta mesma instituição.

No total, foram utilizadas amostras clínicas de 10 bolsas periodontais e 10 canais radiculares, em concordância com os critérios de inclusão do trabalho. Estudos primários respaldaram os procedimentos metodológicos, como as coletas das amostras clínicas e análise das mesmas. As coletas ocorreram nas BP's e nos CR's dos dentes selecionados, onde nas BP's foram denominadas de coletas periodontais (CP), e nos canais de coletas endodônticas (CE), em momentos dessemelhantes, que seguem: CP1 (coleta periodontal inicial); CE1 (coleta endodôntica inicial); CP2 (coleta periodontal após o PQM); CE2 (coleta endodôntica após o PQM).

4.3 Coletas clínicas nas bolsas periodontais:

Primeiramente, o paciente bochechou CLX 0,12% (Periogard® Colgate-Palmolive Industrial Ltda, São Bernardo do Campo, SP), para fins antissépticos. Além disso, o cálculo supragengival foi removido, com o objetivo de facilitar o procedimento clínico de coleta das amostras.

Previamente à coleta inicial, o dente em questão foi isolado, de forma relativa, com a utilização de roletes de algodão, sendo a coleta, propriamente dita, realizada na bolsa periodontal mais profunda, por meio de cones de papel absorventes (calibre FM – Dentsply, Petrópolis, RJ) apirogênicos (esterilizados em calor seco, na estufa, por um período de 30 min a 250°C) e estéreis. Introduziu-se um cone no fundo da bolsa periodontal, por 1 minuto. Esse cone foi, então, transportado para um tubo de vidro apirogênico, armazenado à -20 °C. Essa coleta era destinada à quantificação dos níveis de endotoxinas.

Subsequentemente, 3 cones de papel, um seguido do outro, eram introduzidos na bolsa, permanecendo, cada um, por um período de 1 minuto. Esses cones eram transportados para tubos Eppendorfs, estéreis, que continham 1,0 mL de VMGA III (Viability Medium Goteberg Agar). Essa última coleta era designada ao estudo microbiológico. Com a remoção do isolamento absoluto, logo após finalização do preparo químico-mecânico e selamento do dente com resina fotopolimerizável Z 250 (3M Dental Products, St Paul, EUA), uma nova coleta da bolsa periodontal (CP2) foi realizada como descrita na CP1. Finalizado o tratamento endodôntico, uma nova coleta foi executada na bolsa – CP2 –, conforme descrito na primeira coleta – CP1.

4.4 Coletas clínicas no canal radicular e procedimentos endodônticos:

Técnicas, baseadas em princípios assépticos, foram aplicadas no decorrer da terapia endodôntica: uso de instrumental estéril e apirogênicos; remoção de restaurações infiltradas e cáries; além da instalação do isolamento absoluto e descontaminação do mesmo, visando sempre o livre acesso do instrumento endodôntico no comprimento radiográfica e previamente estabelecido.

Inicialmente ao procedimento, realizou-se a assepsia da região peribucal do paciente, com auxílio da clorexidina gel 2% (Endogel TM, Itapetininga, SP, Brasil). Posteriormente à isso, foi dada a anestesia, na região do elemento dental em questão. Ademais, foi feito um polimento coronário, utilizando-se pedra pomes. Após, o isolamento absoluto foi instalado, com o auxílio de cianocrilato dental (Super Bonder, Loctite, São Paulo, SP), com o intuito de vedar a interface lençol-coroa dental.

A desinfecção da região operatória foi efetuada por meio de swabs estéreis, primeiramente embebidos em H₂O₂ 30% e logo após em NaOCl 5,25%, por um período de tempo de 30 segundos cada. Seguidamente, foi feita a neutralização dessas substâncias, utilizando-se tiosulfato de sódio 5% (solução estéril). A abertura coronária foi, inicialmente, executada com brocas diamantadas de conformação esférica (1016HL, 1014HL ou 1012HL), previamente esterilizadas e apirogênicas, em alta rotação, sendo a irrigação feita com solução salina, manualmente, uma vez que a água do equipo foi desativada.

A forma de conveniência da abertura foi alcançada, através de brocas de ponta inativa tronco-cônicas (3082 - K.G. Sorensen Ltda, Barueri, SP, Brasil). Atingida a forma adequada, a região operatória, incluindo o dente, foram novamente descontaminadas, com as mesmas solução anteriormente citadas. Feito isso, uma lima K#15 (Maillefer/Dentsply, Ballaigues, Suíça) era inserida até o comprimento aparente do CR, precedentemente estabelecido na radiografia inicial. Para a confirmação do comprimento real do canal e patência do mesmo, o localizador apical foi utilizado (Novapex, Forum Technologies, Rishon le-zion, Israel). Cones de papel absorventes, apirogênicos e esterilizados, foram introduzidos nesse comprimento e permaneceram nessa posição por 60 segundos. Quatro cones foram introduzidos, consecutivamente. O primeiro foi transferido para tubos de vidro apirogênicos, armazenados à -20 °C, até o momento de quantificação de endotoxinas presentes. Os demais foram transportados para Eppendorfs estéreis, que continham 1,0 mL de VMGA III – Viability Medium Goteberg. Esses últimos foram congelados à -80°C, sendo essa coleta designada para análise microbiológica.

4.5 Procedimentos endodônticos:

Foi utilizado o sistema Reciproc (VDW, Munich, Germany) para a realização da instrumentação mecânica, sendo a CLX gel 2% a substância química auxiliar selecionada durante o decorrer de todo o PQM. A irrigação foi efetuada a cada troca de instrumentos, com 5 mL de soro fisiológico, acompanhada da aspiração com cânulas apropriadas para tal fim. Outrossim, com o propósito de manter toda a extensão do canal patente, uma lima de pouco calibre (K#10) foi utilizada.

Findado o PQM, os canais foram inundados com 5,0 mL de tween 80 + lecitina de soja 0,07% (solução), com o intuito de neutralizar a CLX, seguido da lavagem com 5,0 mL de solução fisiológica. Um ml de EDTA 17% foi usado para remover a smear layer, por um período de 60 segundos, sob agitação com cones de guta percha, sendo esse procedimento repetido por mais duas vezes. Logo em seguida, essa solução foi removida do canal, através da lavagem com 5 mL de soro. Após esse procedimento, a segunda coleta endodôntica foi efetuada (CE2).

Cones de guta-percha Fine Medium e Medium (Konne Indústria e Comércio de Materiais Odontológicos Ltda., Belo Horizonte, MG) além do cimento Endomethasone (Specialités – Septodont, Saint-Maurdes, Fossés Cedex, France), foram usados para a obturação do sistema de canais radiculares, através da técnica de condensação lateral e do modelamento apical do cone de guta. O selamento definitivo da coroa de todos os elementos foi efetuado, através do posicionamento de 2 mm de Coltosol (Vigodent, Colténe, Rio de Janeiro, RJ) no assoalho da parede pulpar, aplicação de ácido fosfórico 37% e do adesivo 3M Single Bond (3M Dental Products, St. Paul, MN, EUA). Seguidamente, foi realizada a inserção incremental de resina fotopolimerizável Z 250 (3M Dental Products, St. Paul, MN, USA).

A radiografia final foi executada, após o término do procedimento restaurador, sendo a análise radiográfica realizada com o auxílio do negatoscópio. Os pacientes foram, então, encaminhados para tratamento periodontal adequado.

4.6 Técnicas moleculares:

Extração do DNA:

Os eppendorfs, que continham o conteúdo coletado (VMGAI, juntamente com cones de papel absorventes), foram descongelados e colocados no agitador de tubos (MA 162MARCONI, São-Paulo, SP, Brasil). À seguir, foi efetuada a extração do material genético bacteriano, através do kit QIAamp DNA mini kit (QIAGEN, Chatsworth, CA, USA), em conformidade com as instruções do fabricante. Após esse procedimento, a presença de DNA e sua concentração, em cada amostra, foi averiguada por meio de um espectrofotômetro para ácidos nucleicos (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA). Feito isso, as amostras foram recolocadas no freezer à -80 °C.

Nested-PCR:

- a) Reação de PCR universal – Cada reação de amplificação ocorreu com uma quantidade de 50ng de DNA e volume total de 50 µL, ou seja, foram adicionados 37 µL de Água MiliQ estéril em 13 µL do mix de reagentes da PCR, resultando no volume total anteriormente mencionado. Esse mix de reagentes era constituído de 4µL de dNTP; 1 µL Primer Univ F (25 pMol); 1 µL Primer Univ R (25 pMol); 5µL de Buffer 10X PCR; 0,5µL de Platinum Taq DNA Polymerase e 1,5µL de Cloreto de Magnésio.

Para a reação ocorrer, foi necessária uma desnaturação inicial, que teve duração de 4 minutos à 94°C, e 30 ciclos dos seguintes processos: desnaturação (duração de 45 segundos à 94°C); anelamento (duração de 45 segundos à 60°C); extensão (duração de 1,5 min à 72°C) e extensão final (duração de 15 minutos à 72°C).

Esses ciclos aconteceram em um aparelho termociclador (MJ96G, Biocycler, termocicladores, Curitiba, SC, Brasil), e as temperaturas foram devidamente programadas, previamente.

A visualização dos produtos amplificados ocorreu após a realização da eletroforese horizontal em gel de agarose à 1% (0,9 g de agarose ultrapura Invitrogen + 900 mL de TAE 1x), corado com 0,5µL de brometo de etídio (10mg/ml). A reação eletroforética teve duração de 45 minutos, a 90V e sob temperatura ambiente, em um tampão TAE 1X. O controle positivo da reação continha o DNA, que foi extraído de uma cepa bacteriana padrão (ATCC).

O controle negativo continha apenas o mix de reagentes, visto que a finalidade do mesmo é apenas detectar a presença de contaminantes na mistura. Os produtos, que foram visualizados sob luz ultravioleta, de aproximadamente 1500bp, foram considerados positivos.

Tabela 1 - Primers utilizados na reação de PCR universal

Primer	Fragmento	Referência	Sequência
Univ. Forward	1,505 bp		5' AG AGT TTG ATY MTG GCT CAG 3'
Univ. Reverse			5' ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT 3'

- b) Reação espécie-específica – O produto da primeira reação universal serviu como substrato para a realização dessa segunda reação, agora utilizando os primers espécies-específicos para *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia* e *Porphyromonas gingivalis*

Tabela 2: Reações e “primers” espécie – específicos

Espécie	Fragmento	Referência	Sequência	Ciclos
<i>T. forsythia</i>	641 bp		F: 5' TGC TTC AGT GTC AGT TAT ACC T 3' R: 5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3'	Desnaturação inicial 95°C por 2 min e 36 ciclos: 94°C por 30s, 56°C por 1min, 72°C por 2min e extensão final 72°C por 10 min
<i>T. denticola</i>	316 bp		F: 5' TAA TAC CGT ATG TGC TCA TTT ACA T 3' R: 5'TCA AAG AAG CAT TCC CTC TTC TTC TTA 3'	Desnaturação inicial 95°C por 2 min e 36 ciclos: 94°C por 30s, 58°C por 1min, 72°C por 2min e extensão final 72°C por 10 min

<i>P. gingivalis</i>	478 bp	F: 5' CAA TAC TCG TAT GCC CGT TAT TC 3'	Desnaturação inicial 95°C por 2 min e 36 ciclos: 94°C por 30s, 58°C por 1min, 72°C por 2min e extensão final 72°C por 10 min
		R: 5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3'	

4.7 Quantificação de Endotoxinas:

Foi realizado um ensaio cinético quantitativo, através do teste turbidimétrico Limulus Amebocyte Lysate (Lonza, Walkersville, MD, EUA), que permitiu que cada amostra entrasse em contato com o reagente reconstituído LAL. Após, as amostras foram colocadas em um leitor de placas específico, cujo monitoramento ocorreu automaticamente, por meio de um software, até o início do aparecimento de turvação. O tempo da reação, antes que a turvação apareça, é inversamente proporcional à concentração de endotoxina em cada amostra.

O kit (Pyrogent-5000®) é composto por: Pyrogent-5000® LAL Reagente; Endotoxina de Escherichia coli 055:B5; Tampão de reconstituição Pyrogent-5000. Além disso, são necessárias algumas outras substâncias, contidas no kit, como: Água Reagente LAL (Lonza, Walkersville, MD, EUA); Hidróxido de sódio 0.1 N ou Ácido clorídrico 0.1 N, dissolvidos em água reagente LAL, a fim de ajustar o pH; Tubos de vidro descartáveis para diluição, isentos de endotoxina; Ponteiras estéreis descartáveis de 10 µL, 200 µL e 1000 µL; Microplacas estéreis descartáveis (Corning Costar, Cambridge, MA, UK); Multipipetador de 8 canais; Reservatórios de reagentes (Lonza, Walkersville, MD); Leitor de microplacas (Ultramark, Bio-Rad Laboratories); Software WinKQCL® (Lonza, Walkersville, MD); Cronômetro e agitador vortex.

Padronização da Curva Padrão:

Como parâmetro para calcular a concentração de endotoxinas, a curva padrão foi conseguida, por meio da reconstituição do liofilizado de endotoxina, numa concentração de 100EU/mL, cujas concentrações finais, através das diluições, alcançaram concentrações de: 0,01, 0,1, 1, 10, 100 EU/mL, respectivamente, em conformidade com as instruções do fabricante.

Diluições seriadas para obtenção das concentrações de endotoxina da curva-padrão:

Adicionou-se 0,1 ml de 100 EU/ml endotoxina estoque em 0,9 ml de água para reagente LAL, resultando numa concentração de 10 EU/ml de endotoxinas. Essa solução foi agitada em vortex, por mais ou menos 1 minuto, anteriormente ao procedimento;

Transferiu-se 0,1 ml da solução de endotoxina 10 EU/ml em 0,9 ml de água para reagente LAL, para um recipiente adequado, resultando numa concentração de 1 EU/ml. Agitou-se a solução em vortex, por mais ou menos 1 minuto, anteriormente ao procedimento; Transferiu-se 0,1 ml da solução de endotoxina 1 EU/ml em 0,9 ml de água para reagente LAL, para um recipiente adequado, resultando numa concentração de 0,10 EU/ml. Agitou-se essa solução em vortex, por mais ou menos 1 minuto, anteriormente ao procedimento; Transferiu-se 0,1 ml da solução de endotoxina 0,10 EU/ml em 0,9 ml de água para reagente LAL, para um recipiente adequado, resultando numa concentração de 0,01 EU/ml. Agitou-se essa solução em vortex, por mais ou menos 1 minuto, anteriormente ao procedimento.

Padronização das diluições das amostras:

Os frascos de vidro, que continham as amostras advindas dos CR's e BP's, foram colocadas em banho-maria (37°C), por 30min. As mesmas foram reconstituídas em 1 mL de água de LAL, e em seguida, extraídas sob agitação em vortex, por 60 segundos. Fatores que impedissem a detecção de endotoxinas foram prevenidos, o que justifica a adição de uma concentração conhecida de endotoxina (0,1 EU/ml), em cada amostra, sendo esse procedimento denominado "Spike". Os testes foram, então, efetuados em triplicata: 3 poços contendo 100 µL da amostra mãe ou suas diluições; e 3 poços contendo 100 µL amostra + 0.1 EU/mL de endotoxina (Spike). O teste foi realizado como descrito à seguir. A fim de evitar interferências, sejam elas de inibição ou desenvolvimento, durante a reação, a concentração de endotoxina recuperada dos poços contaminados, calculada pelo software, permaneceu entre 50% - 200%, valor denominado como controle positivo do produto (PPC).

Plate Layout:

Utilizaram-se placas de cultura de células apirogênicas, para a quantificação das endotoxinas (96 poços – 12 colunas e 8 fileiras) (Corning Costar, Cambridge, MA). Primeiro, foram inoculados 100 µL do "blank" (água de LAL), em triplicata, na placa. Seguidamente, 100 µL de cada ponto da curva padrão, nas diferentes concentrações (100 EU/mL, 10 EU/mL, 1 EU/mL, 0,10 EU/mL e 0,01 EU/mL), foram inoculados, também em triplicata, na placa. Após, 100 µL das amostras, e seus respectivos PPC, ambos em triplicata, foram inoculados com reagente LAL. Foram adicionados 10 µL de 0,1 EU/mL de endotoxina de E. coli (spike) para cada poço. A placa foi colocada no leitor de ELISA (Ultramark, Bio-Rad Laboratories), com Software WinKQCL®, programado para - 340 nm, 37 ° C e 100 leituras - 100 µL do reagente de LAL foram adicionados em todos os poços. A leitura das placas ocorreu por aproximadamente aproximadamente 60 minutos.

Cálculo da concentração de endotoxinas:

Durante todo o ensaio, o leitor de microplacas/software Kinetic-QCL foi monitorado na absorvância de 340nm de cada orifício da microplaca. Através da leitura de absorvância inicial, de cada orifício, como seu próprio branco, o leitor determinou o tempo necessário para que a absorvância aumentasse a 0.03 unidades. Este tempo foi denominado Tempo de Reação. O software WinKQCL executou automaticamente uma correlação linear log/log do Tempo de Reação, de cada padrão, com a concentração de endotoxinas correspondentes.

5 RESULTADOS

Os 10 dentes usados nesse estudo foram provenientes de 10 pacientes avaliados. Os dentes apresentavam, sem excessão, bolsas periodontais com profundidade de sondagem maior ou igual à 6mm, lesão no periápice e necrose da polpa. Além disso, os mesmos eram do grupo dos incisivos, caninos, molares e pré-molares. Clinicamente, todos se apresentavam com mobilidade, tendo restaurações ou não (hígidos).

5.1 NESTED-PCR

5.1.1 Canal Radicular

O microrganismo mais encontrado nos canais radiculares, na primeira coleta (antes do PQM) foi o *Treponema denticola* (100%, 10/10), seguido de *Porphyromonas gingivalis* (40%, 4/10) e *Tannerella forsythia* (20%, 2/10). Dados na Tabela 1.

Após o preparo químico mecânico, o mais frequente foi: *Tannerella forsythia* (50%, 5/10), seguido de *Treponema denticola* (40%, 4/10) e *Porphyromonas gingivalis* (40%, 4/10). Dados na Tabela 3.

5.1.2 Bolsa Periodontal

Os microrganismos mais encontrados, pelo método Nested-PCR, na primeira coleta das bolsas periodontais foram: *Treponema denticola* (100%, 10/10), seguido de *Tannerella forsythia* (70%, 7/10) e *Porphyromonas gingivalis* (40%, 4/10). Dados na Tabela 1.

Após o preparo químico mecânico: *Treponema denticola* (90%, 9/10), seguido de *Tannerella forsythia* (50%, 5/10) e *Porphyromonas gingivalis* (50%, 5/10). Dados na tabela 3.

Tabela 3 - Avaliação das espécies bacterianas *Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis* e *Tannerella forsythia* nas bolsas periodontais (CP) e canais radiculares (CE), antes e depois do PQM, respectivamente

	CP 1	CP 2	CE 1	CE 2
<i>Treponema denticola</i>	100% (10/10)	90% (9/10)	100% (10/10)	40% (4/10)
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	40% (4/10)	50% (5/10)	40% (4/10)	40% (4/10)
<i>Tannerella forsythia</i>	70% (7/10)	50% (5/10)	20% (2/10)	50% (5/10)

*CP1: coleta na bolsa periodontal antes do PQM/ CP2: coleta na bolsa periodontal depois do PQM/ CE1: coleta no canal radicular antes do PQM/ CE2: coleta no canal radicular depois do CMP

5.2 Quantificação de endotoxinas:

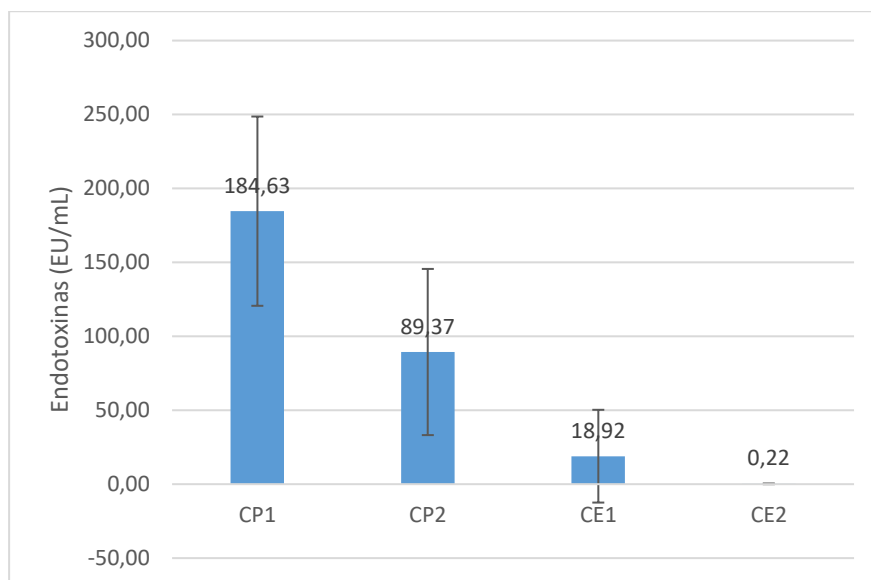
Para a avaliação quantitativa das endotoxinas, foram considerados os 10 dentes e as amostras avaliadas: iniciais (CP1 e CE1) e após PQM (CP2 e CE2) das bolsas periodontais (CP) e dos canais radiculares (CE). Por meio do teste turbidimétrico (LAL) foi observado que o LPS esteve presente em todas as amostras, tanto da bolsa quanto do canal, em todo o tratamento (antes e após o PQM).

5.2.1 Canal Radicular

Nas coletas iniciais dos canais radiculares, a média do valor de endotoxinas detectada foi de 18,92 EU/mL. Após o PQM, o valor mudou para 0,22 EU/mL, com percentual de redução de 99,43%. Dados no Gráfico 1.

5.2.2 Bolsa Periodontal

Nas coletas iniciais das bolsas periodontais, a média do valor de endotoxinas detectada foi 184,63 EU/mL. Após o PQM, a média foi de 89,37 EU/mL, com percentual de redução de 72,45 %. Dados no Gráfico 1.



*CP1: coleta na bolsa periodontal antes do PQM/ CP2: coleta na bolsa periodontal depois do PQM/ CE1: coleta no canal radicular antes do PQM/ CE2: coleta no canal radicular depois do PQM

Gráfico 1 - Média e desvio padrão das endotoxinas nos diferentes momentos de coleta (bolsa periodontal antes e depois do PQM e canal radicular antes e depois do PQM)

6 DISCUSSÃO

A literatura científica é bastante robusta, no que concerne ao estudo do conteúdo microbiológico e endotóxico das patologias endodônticas (Gomes et al., 2004, 1996 a,b,c, 2007; Siqueira et al. 2003 a,b 2009; Brito et al., 2012; Nóbrega et al., 2013; Herrera et al., 2016) e periodontais (Slots, 1986; Haffajee et al., 1984; Socransky et al., 1988, Dahlén et al., 1992; Paster et al., 2001, 2006; Casarin et al., 2013; Dahlen et al., 2019), separadamente. Entretanto, a escassez de trabalhos, voltados à análise de microrganismos periodontopatogênicos e de seus fatores de virulência, em canais radiculares e bolsas periodontais, nos dentes com lesões endodônticas-periodontais combinadas foram fatores motivacionais para o desenvolvimento desse estudo. O predomínio de periodontopatógenos, como os que compõe o Complexo Vermelho, nas patologias pulpares e periodontais é subestimado, se analisados por métodos tradicionais de cultivo microbiológico, devido à alta exigência dos mesmos com relação aos requerimentos nutricionais e gasosos. Por isso a grande importância dos métodos moleculares mais sensíveis, para a detecção de bactérias de difícil cultivo, como as espécies do gênero *Treponema* ssp. (Conrads et al., 1997; Gonçalves eamp; Mouton, 1999; Siqueira et al., 2000a; Siqueira et al., 2000b, Berber, 2009; Gomes et al., 2015).

Treponema denticola, *Tannerella forsythia* e *Porphyromonas gingivalis* são bactérias anaeróbias Gram-negativas, e a notória importância das mesmas, dentro das doenças endodônticas e periodontais, é justificada pela presença do lipopolissacarídeo bacteriano, presente da membrana externa, da parede celular, das bactérias Gram-negativas (Seltzer eamp; Farber, 1994; Nissan et al., 1995; NelsonFilho et al., 2002; Oliveira et al., 2005; Pereira, 2011; Herrera et al., 2016).

Diante do exposto, o intuito deste trabalho foi analisar a suscetibilidade das bactérias do Complexo Vermelho aos procedimentos químicos-mecânicos, em 10 canais radiculares e 10 bolsas periodontais de dentes com lesões endo- periodontais combinadas, através do Nested-PCR e investigar os efeitos do PQM na redução dos níveis endotóxicos, através da quantificação de LPS, presentes nas amostras coletadas de ambos os sítios.

6.1 Nested-PCR

A espécie *Treponema denticola* foi a mais frequentemente detectada, nas bolsas periodontais, antes (100% - 10/10) e após o PQM (90% - 9/10). Resultados semelhantes foram encontrados no estudo de Berber, 2009, em que a espécie esteve presente em 75% das amostras iniciais das bolsas periodontais e em 80% das amostras coletadas após o PQM.

Chapola, 2017 demonstrou que a mesma espécie também foi a mais frequentemente detectada, nas bolsas periodontais, antes do PQM, e que após o mesmo, as três espécies do Complexo Vermelho foram igualmente prevalentes (71,4%). O predomínio de *Treponema denticola*, dentre as espécies integrantes do Complexo Vermelho, nas bolsas periodontais, pode ser explicado devido à forma helicoidal que as bactérias do gênero espiroquetas possuem, o que confere a elas a capacidade de adentrarem-se nos tecidos periodontais mais profundos (Rôças et al., 2003; Siqueira eamp; Rôças, 2003; Foschi et al., 2005; Montagner et al., 2010). *Treponema denticola* esteve presente em 100% dos casos iniciais nas bolsas periodontais e nos canais radiculares. Semelhantemente, *Porphyromonas gingivalis*, foi encontrada em 40% dos casos iniciais, em ambos os sítios.

Esses resultados sugerem que as vias de comunicação, entre polpa e periodonto, podem ser importantes fatores etiopatogênicos, envolvidos no desenvolvimento e manutenção das lesões endo-periodontais (Berber, 2009; Gomes et al., 2015; Chapola, 2017, Duque et al., 2018).

6.2 Endotoxinas

Inicialmente ao PQM, a concentração de endotoxinas, nas bolsas periodontais, apresentou valores elevados, fato que pode ser explicado devido à maior prevalência de Gram-negativos, em bolsas periodontais profundas (Paster et al., 2000; Mineoka et al., 2008; Liu et al., 2012; Suzuki et al., 2014; Puig-Silla et al., 2016). Após o PQM, foi observado uma redução de 72,45% desses níveis, o que novamente enfatiza a grande relevância que as vias de comunicação anatômica possuem, dentro das lesões endo-periodontais combinadas.

Paralelamente a isso, existem estudos que defendem a neutralização do LPS, pelo uso da clorexidina, que é uma bisbiguanida anfipática (Zorko eamp; Jerela, 2008).

Um dos critérios de inclusão para este estudo foi dentes que apresentassem condição pulpar necrótica, por isso, a média inicial encontrada nos canais radiculares, apresentou valor relativamente alto (18,92 EU/mL). Esses dados corroboram com Chapola, 2017, que, estudando o conteúdo microbiológico e endotóxico das lesões endo-periodontais combinadas, antes e após as diferentes etapas do tratamento endodôntico, obteve um valor médio inicial, nos CR's, de 15,6 EU/mL. Após os procedimentos biomecânicos de desinfecção dos canais radiculares, a média da concentração de endotoxinas apresentou valor praticamente nulo (0,22 EU/mL), ou seja, houve uma redução de 99,43% em comparação com a média inicial, dados que corroboram com os estudos prévios da literatura (Safavi eamp; Nichols, 1993; Silva et al., 2002; Nelson Filho et al., 2002; Signorreti, 2009; Marinho et al., 2015; Chapola, 2017).

3 CONCLUSÃO

- *Treponema denticola* foi a espécie do Complexo Vermelho mais prevalente nas bolsas periodontais, antes e após o PQM;
- O PQM foi capaz de alterar a carga microbiana tanto nos CR's quanto nas BP's;
- O PQM reduziu o nível das endotoxinas nos CR's e nas BP's dos dentes analisados.

REFERÊNCIAS

- Adriaens PA, De Boever JA, Loesche WJ: Bacterial invasion in root cementum and radicular dentin of periodontally diseased teeth in humans. A reservoir of periodontopathic bacteria. *J Periodontol.* 1988 Apr;59(4):222-30.
- Al Attas MA, Edrees HY, Sammani AMN, Madarati AA. Multidisciplinary management of concomitant pulpal and periodontal lesion: A case report. *J Taibah Univ Med Sci.* 2017 Jun 27;12(5):455-460. doi: 10.1016/j.jtumed.2017.05.010.
- Al-Hebshi NN, Shuga-Aldin HM, Al-Sharabi AK, Ghandour I. Subgingival periodontal pathogens associated with chronic periodontitis in Yemenis. *BMC Oral Health.* 2014 Feb 18;14:13.
- Baumgartner JC, Khemaleelakul SU, Xia T. Identification of spirochetes (treponemes) in endodontic infections. *J Endod.* 2003;29:794–797.
- Berber VB. Identificação da microbiota das lesões endo-periodontais por cultura e PCR e sua suscetibilidade ao preparo químico-mecânico e a medicações intracanais entre sessões de atendimento [tese]. Piracicaba: Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas; 2009.
- Berkiten M, Okar I, Berkiten R. In vitro study of the penetration of *Streptococcus sanguis* and *Prevotella intermedia* strains into human dentinal tubules. *J Endod.* 2000 Apr;26(4):236-9.
- Beutler B. Innate immunity: an overview. *Mol Immunol.* 2004 Feb;40(12):845-9.
- Byström A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. *Scand. J. Dent. Res.* 1981; 89: 321-8.
- Carrigan PJ, Morse DR, Furst ML, Sinai I. A scanning electron microscopic evaluation of human dentinal tubules according to age and location. *J Endod.* 1984 Aug;10(8):359-63.
- Chapola RC. Lesões endo-periodontais combinadas: caracterização microbiológica e endotóxica. [tese]. Piracicaba: Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas; 2017.
- De Deus QD. Endodontia. 5. ed. Rio de Janeiro: MEDSCI; 1992.
- Dixon DR, Darveau RP. Lipopolysaccharide heterogeneity: innate host responses to bacterial modification of lipid A structure. *J Dent Res.* 2005 Jul;84(7):584-95.
- Duque TM. Análise microbiológica por PCR, quantificação de endotoxinas e monitoramento inflamatório em pacientes com doença periodontal crônica. [tese]. Piracicaba: Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas; 2016.
- Fabricius L, Dahlén G, Ohman AE, Möller AJ. Predominant indigenous oral bacteria isolated from infected root canals after varied times of closure. *Scand J Dent Res.* 1982 Apr;90(2):134-44.
- Ferraz CC, Gomes BP, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. In vitro assessment of the antimicrobial action and the mechanical ability of chlorhexidine gel as an

endodontic irrigant. *J Endod.* 2001 Jul;27(7):452-5.

Ferraz CC, Gomes BP, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Comparative study of the antimicrobial efficacy of chlorhexidine gel, chlorhexidine solution and sodium hypochlorite as endodontic irrigants. *Braz Dent J.* 2007;18(4):294-8.

Figdor D, Davies JK, Sundqvist G. Starvation survival, growth and recovery of *Enterococcus faecalis* in human serum. *Oral Microbiol Immunol.* 2003 Aug;18(4):234-9.

Figdor D, Sundqvist G. A big role for the very small--understanding the endodontic microbial flora. *Aust Dent J.* 2007 Mar;52(1 Suppl):S38-51.

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;20:289-295.

Gomes BP, 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 Oct;35(10):1350-3.

Gomes BP, Vianna ME, Zaia AA, Almeida JF, Souza-Filho FJ, Ferraz CC. Chlorhexidine in endodontics. *Braz Dent J.* 2013 Apr;24(2):89-102.

Gomes BP, Berber VB, Kokaras AS, Chen T, Paster BJ. Microbiomes of endodontic- periodontal lesions before and after chemomechanical preparation. *J Endod.* 2015 Dec;41(12):1975-84.

Grudianov AI, Makeeva MK, Piatgorskaia NV. Modern concepts of etiology, pathogenesis and treatment approaches to endo-perio lesions. *Vestn Ross Akad Med Nauk.* 2013 Jan;(8):34-6.

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 May;91(5):587-93.

Kirkham DB. The location and incidence of accessory pulpal canals in periodontal pockets. *J Am Dent Assoc.* 1975 Aug;91(2):353-6.

Lanza E, Magan-Fernandez A, Bermejo B, de Rojas J, Marfil-Alvarez R, Mesa F. Complementary clinical effects of red complex bacteria on generalized periodontitis in a caucasian population. *Oral Dis.* 2016 Jul;22(5):430-7.

Lowenguth RA, Greenstein G. Clinical and microbiological response to nonsurgical mechanical periodontal therapy. *Periodontol 2000.* 1995 Oct;9:14-22.

Martinho FC, Gomes BP. Quantification of endotoxins and cultivable bacteria in root canal infection before and after chemomechanical preparation with 2.5% sodium hypochlorite. *J Endod.* 2008 Mar;34(3):268-72.

Martinho FC, Chiesa WM, Marinho AC et al. Clinical investigation of the efficacy of chemomechanical preparation with rotary nickel-titanium files for removal of endotoxin from primarily infected root canals. *J Endod.* 2010 Nov;36(11):1766-9.

- Martinho FC, Chiesa WM, Zaia AA, Ferraz CC, Almeida JF, Souza-Filho FJ, Gomes BP. Comparison of endotoxin levels in previous studies on primary endodontic infections. *J Endod.* 2011 Feb;37(2):163-7.
- Minabe M, Takeuchi K, Kumada H, Umemoto T. The effect of root conditioning with minocycline HCl in removing endotoxin from the roots of periodontally-involved teeth. *J Periodontol.* 1994 May;65(5):387-92.
- Nagaoka S, Miyasaki FJ, Liu HJ, Iwamoto Y, Kitano M, Kawagoe M. Bacterial invasion into dentinal tubules of human vital and nonvital teeth. *J Endod.* 1995; 21: 70-73.
- Nakib NM, Bissada NF, Simmelink JW, Goldstine SN. Endotoxin penetration into root cementum of periodontally healthy and diseased human teeth. *J Periodontol.* 1982 Jun;53(6):368-78.
- Ng HM, Kin LX, Dashper SG, Slakeski N, Butler CA, Reynolds EC. Bacterial interactions in pathogenic subgingival plaque. *Microb Pathog.* 2016 May;94:60-9.
- Nyman S, Westfelt E, Sarhed G, Karring T. Role of "diseased" root cementum in healing following treatment of periodontal disease. A clinical study. *J Clin Periodontol.* 1988 Aug;15(7):464-8.
- Paster BJ, Olsen I, Aas JA, Dewhirst FE. The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. *Periodontol 2000.* 2006 Aug;42:80-7.
- Rotstein I, Simon JH. Diagnosis, prognosis and decision-making in the treatment of combined periodontal-endodontic lesions. *Periodontol 2000.* 2004;34:165-203. Review.
- Rubach WC, Mitchell DF. Periodontal disease, accessory canals and pulp pathosis. *J Periodontol.* 1965 Jan-Feb;36:34-8.
- Safavi KE, Nichols FC. Effect of calcium hydroxide on bacterial lipopolysaccharide. *J Endod.* 1993 Feb;19(2):76-8.
- Shambarger S, Johnson D, Versulius-Tantbirojin D, Bowles WR, McClanahan SB. The incidence of furcation region patency in molars before and after simulated periodontal therapy. *Northwest Dent.* 2015 Mar-Apr;94(2):27-32.
- Singh P. Endo-perio dilemma: a brief review. *Dent Res J (Isfahan).* 2011 Winter;8(1):39-47.
- Siqueira JF, Jr, Rocas IN. Treponema species associated with abscesses of endodontic origin. *Oral Microbiol Immunol.* 2004;19:336-339.
- Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent Jr RL. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol.* 1998 Feb;25(2):134-44.
- Sundqvist G. Taxonomy, ecology, and pathogenicity of the root canal flora. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1994 Oct;78(4):522-30.

Sunitha V R, Emmadi P, Namasivayam A, Thyegarajan R, Rajaraman V. The periodontal - endodontic continuum: A review. *J Conserv Dent*. 2008 Apr;11(2):54-62. doi: 10.4103/0972-0707.44046.

Teles R, Sakellari D, Teles F, Konstantinidis A, Kent R, Socransky S, Haffajee A. Relationships among gingival crevicular fluid biomarkers, clinical parameters of periodontal disease, and the subgingival microbiota. *J Periodontol*. 2010 Jan;81(1):89-98.

Tsai CY, Tang CY, Tan TS, Chen KH, Liao KH, Liou ML. Subgingival microbiota in individuals with severe chronic periodontitis. *J Microbiol Immunol Infect*. 2016 May 13. pii: S1684-1182(16)30037-8.

Walton RE, Torabinejad M. *Princípios e Prática em Endodontia*. 1. ed. São Paulo: Santos; 1997.

Zaruba M, Rechenberg DK, Thurnheer T, Attin T, Schmidlin PR. Endodontic drug delivery for root surface disinfection: a laboratory feasibility evaluation. *Clin Oral Investig*. 2016 Apr;20(3):607-13. doi: 10.1007/s00784-015-1538-9.

Zehnder M, Gold SI, Hasselgren G. Pathologic interactions in pulpal and periodontal tissues. *J Clin Periodontol*. 2002 Aug;29(8):663-71. Review.

Zorko M, Jerala R. Alexidine and chlorhexidine bind to lipopolysaccharide and lipoteichoic acid and prevent cell activation by antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 2008; 62(4): 730-7.

ANEXOS

Anexo 1 – Verificação de originalidade e prevenção de plágio

INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DO PREPARO QUÍMICO-MECÂNICO SOB AS BACTÉRIAS DO COMPLEXO VERMELHO E SOB OS NÍVEIS DE ENDOTOXINA, EM CANAIS RADICULARES E BOLSAS PERIODONTAIS DE DENTES COM LESÕES ENDO-PERIODONTA

ORIGINALITY REPORT

19%	19%	0%	1%
SIMILARITY INDEX	INTERNET SOURCES	PUBLICATIONS	STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1	repositorio.unicamp.br	19%
	Internet Source	

Exclude quotes	On	Exclude matches	< 1%
Exclude bibliography	Off		

Anexo 2 – Comitê de Ética em Pesquisa



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



CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa "Investigação microbiológica e de seus fatores de virulência nas diferentes patologias pulpares e periradiculares e sua interação com o sistema imunológico inato", CAAE 48374615.7.0000.5418, dos pesquisadores Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes, Augusto Rodrigues Lima, Priscila Amanda Francisco, João Carlos Leme Junior, Eloá Cristina Bicego Pereira, Rafaela Casadei Chapola, Pedro Ivo da Graça Fagundes e Maria Vitoria Bello Avolio, satisfaz as exigências das resoluções específicas sobre ética em pesquisa com seres humanos do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde e foi aprovado por este comitê em sua versão original 21/10/2015 e na versão emendada em 30/09/2019.

The Research Ethics Committee of the Piracicaba Dental School of the University of Campinas (FOP-UNICAMP) certifies that research project "MICROBIOLOGICAL AND VIRULENCE FACTORS INVESTIGATION IN DIFFERENT PULP AND PERIRADICULAR PATHOLOGIES AND THEIR INTERACTION WITH INNATE IMMUNE SYSTEM", CAAE 48374615.7.0000.5418, of the researcher's Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes, Augusto Rodrigues Lima, Priscila Amanda Francisco, João Carlos Leme Junior, Eloá Cristina Bicego Pereira, Rafaela Casadei Chapola, Pedro Ivo da Graça Fagundes and Maria Vitoria Bello Avolio, meets the requirements of the specific resolutions on ethics in research with human beings of the National Health Council - Ministry of Health, and was approved by this committee on 21th of October of 2015 (original version) and 30th of September of 2019 (amended version).

Prof.ª. Fernanda Miori Pascon
Vice Coordenador
CEP/FOP/UNICAMP

Prof. Jacks Jorge Junior
Coordenador
CEP/FOP/UNICAMP

Nota: O título do protocolo e a lista de autores aparecem como fornecidos pelos pesquisadores, sem qualquer edição.
Notice: The title and the list of researchers of the project appears as provided by the authors, without editing.