



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

ALINE VITORIA DE SOUZA NOGUEIRA

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE BACTÉRIAS CULTIVÁVEIS,
ENDOTOXINAS E DE ÁCIDO LIPOTEICÓICO EM DENTES COM
POLPA NORMAL E PULPITE IRREVERSÍVEL**

**PIRACICABA
2021**

ALINE VITORIA DE SOUZA NOGUEIRA

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE BACTÉRIAS CULTIVÁVEIS,
ENDOTOXINAS E DE ÁCIDO LIPOTEICÓICO EM DENTES COM
POLPA NORMAL E PULPITE IRREVERSÍVEL**

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.

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

Coorientador: Dr. Rodrigo Arruda Vasconcelos

Coorientador: Lidiane Mendes Louzada

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO APRESENTADO PELA ALUNA ALINE VITORIA DE SOUZA NOGUEIRA E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. BRENDA PAULA FIGUEIREDO DE ALMEIDA GOMES.

PIRACICABA

2021

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

N689a Nogueira, Aline Vitoria de Souza, 1996-
Avaliação dos níveis de bactérias cultiváveis, endotoxinas e de ácido lipoteicoico em dentes com polpa normal e pulpite irreversível / Aline Vitoria de Souza Nogueira. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2021.

Orientador: Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes.
Coorientadores: Rodrigo Arruda Vasconcelos e Lidiane Mendes Louzada.
Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Ácido lipoteicoico. 2. Bactérias. 3. Endodontia. 4. Endotoxina. 5. Pulpite. I. Gomes, Brenda Paula Figueiredo de Almeida. II. Arruda-Vasconcelos, Rodrigo, 1988-. III. Louzada, Lidiane Mendes, 1993-. IV. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. V. Título.

Informações adicionais, complementares

Palavras-chave em inglês:

Lipoteichoic acid

Bacteria

Endodontics

Endotoxins

Pulpitis

Titulação: Cirurgião-Dentista

Data de entrega do trabalho definitivo: 15-10-2021

DEDICATÓRIA

Aos meus motivos de persistência mesmo nos momentos difíceis, meus pais, Francisca e Nelson, por sempre apoiarem minhas escolhas e por todos os anos de carinhos e incentivos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à minha família, meus pais, irmãos e sobrinhos, por colaborarem na realização dos meus sonhos e por todos os anos de afeto e comemorações.

À **Profa. Dra. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes** por todos os anos de dedicação, incentivos, aprendizados e cuidados com os alunos. Obrigada por me manter motivada em todos os momentos.

Aos meus coorientadores, **Rodrigo Arruda Vasconcelos** e **Lidiane Mendes Louzada**, sem vocês nada seria possível. Gratidão por todos os ensinamentos, apoios e afetos. Vocês são motivos de inspiração para minha carreira.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, na figura do Diretor, **Prof. Dr. Francisco Haiter Neto**, por fornecer toda a estrutura necessária para a realização deste sonho.

Ao meu antigo professor e grande amigo, **Felipe Seierup**, por me mostrar que os sonhos são possíveis através de muita dedicação e persistência, além de sempre me mostrar os melhores caminhos e me ensinar muito além da matemática.

À minha grande amiga **Joice Graciani**, pois ao seu lado partilhei grandes histórias durante o curso de graduação. Obrigada por cada abraço e por me dar certeza que nossa amizade irá perpetuar além da faculdade.

À minha irmã de coração, **Tamiris Pereira**, por cada dia paciência, incentivo e por todos nossos anos de amizade.

Ao meu grande amigo e dupla de clínica, **Claudio Trigo**, por todos os momentos compartilhados, existindo muita paciência, ensinamentos e afetos. Agradeço por todos esses anos ao seu lado.

À minha turma, T61, por todos esses incríveis anos de graduação.

Ao meu namorado, **Danilo Gomes**, por me motivar, me dar palavras de carinho e sempre melhorar minha auto-estima. Agradeço por poder partilhar minha vida ao seu lado.

Ao **Serviço de Apoio ao Estudante, SAE/UNICAMP**, pelo auxílio financeiro durante minha graduação.

Aos pacientes que voluntariamente aceitaram participar desta pesquisa e por toda a contribuição para com a ciência.

RESUMO

Fatores de virulência (FV) presentes em micro-organismos são capazes de ativar respostas imunológicas do hospedeiro. O ácido lipoteicóico e os lipopolissacarídeos (endotoxinas, LPS) são os principais FV de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, respectivamente. Este estudo investigou a presença de bactérias cultiváveis, de LPS e de LTA de canais radiculares de dentes com polpa normal (PN) e com pulpite irreversível sintomática (PI). Foram selecionados 30 pacientes (20 com PI e 10 com PN – dente hígido indicado ao tratamento endodôntico por finalidade protética). As amostras foram coletadas através de pontas de papel absorvente em toda a extensão dos canais radiculares, antes do preparo químico-mecânico. Os níveis de bactérias cultiváveis (cultura microbiana), de LPS (método turbidimétrico LAL Pyrogen 5000) e de LTA (ensaio de imunoabsorção enzimática - ELISA) foram avaliados. A análise estatística foi realizada com nível de significância de 5%. O resultado da cultura microbiana mostrou que não houve crescimento bacteriano em dentes com PN. Por outro lado, em dentes com PI foi detectado a presença de bactérias cultiváveis em todas as amostras com valor médio de $3,9 \times 10^2$ UFC/mL. O LPS foi encontrado em todas as amostras de dentes com PI com níveis 4 vezes maiores que em com PN. O LTA foi identificado em menores níveis em dentes com PN do que em dentes com PI. Conclui-se que dentes com PI apresentaram maiores níveis microbianos e de fatores de virulência comparados a dentes com PN, evidenciando intensa agressão microbiana ao complexo dentino-pulpar.

Palavras-chave: Ácido lipoteicóico. Bactérias. Endodontia. Endotoxina. Pulpite.

ABSTRACT

Virulence factors (VF) present in microorganisms can trigger hosts' immunological responses. Lipoteichoic acid (LTA) and lipopolysaccharides (endotoxins, LPS) are the main VF of Gram-positive and Gram-negative, respectively. This study investigated the presence of cultivable bacteria, LPS and LTA from root canals of teeth with normal pulp (NP) and those with symptomatic irreversible pulpitis (IP). Thirty patients (20 with IP and 10 with NP – pristine teeth referred to endodontic treatment due to prosthetic reasons) were selected. Samples were collected by using sterile absorbent paper points into the full length of the root canals, before chemomechanical preparation. The levels of cultivable bacteria (culture method), LPS (turbidimetric method LAL Pyrogent 5000) and LTA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay – ELISA) were evaluated. Statistical analysis was performed with significant level set at 5%. Microbial culture revealed no growth in teeth with NP. On the other hand, in teeth with IP, it was detected microbial growth with mean value of $3,9 \times 10^2$ UFC/mL. LPS was detected in all samples of teeth with IP with the levels 4 times higher than those with NP. LTA was detected at lower levels in teeth with NP than those with IP. In conclusion, teeth with IP presented higher microbial levels, as well as virulence factors than teeth with NP, evidencing intense microbial aggression to the dentine-pulp complex.

Keywords: Lipoteichoic acid. Bacteria. Endodontics. Endotoxin. Pulpitis.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DA LITERATURA	13
2.1 Polpa dental e principais vias de contaminação	13
2.2 Relação de microrganismos e infecções pulpares	13
2.3 Bactérias Gram-negativas e endotoxinas	14
2.3.1 Detecção e quantificação de LPS	15
2.4 Cultura microbiana e métodos moleculares	16
2.5 Bactéria Gram-positiva e ácido lipoteicóico	17
3 PROPOSIÇÃO	19
4 MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1 Autorização para realização da pesquisa	20
4.2 População de estudo	20
4.3 Procedimento de descontaminação	21
4.4. Coleta de amostra e tratamento endodôntico	22
4.5 Procedimentos laboratoriais	24
4.5.1 Cultura microbiana	24
4.5.2. Análise dos níveis de endotoxina	24
4.5.3 Análise dos níveis de ácido lipoteicóico	25

4.5.4 Análise estatística	25
5 RESULTADOS	27
5.1 Características clínicas	27
5.2 Contagem de UFC	27
5.3 Níveis de LPS	28
5.4 Níveis de LTA	29
6 DISCUSSÃO	30
7 CONCLUSÃO	33
REFERÊNCIAS	34
ANEXOS	42
1 - Verificação de originalidade e prevenção de plágio	42
2 - Comitê de Ética em Pesquisa	43

1 INTRODUÇÃO

A cavidade oral abriga uma das maiores diversidades de micro-organismos do corpo humano, incluindo fungos, leveduras, protozoários, vírus, arqueias e bactérias (Avila et al., 2009). As bactérias estão em maior número e são responsáveis pelas duas doenças bacterianas mais comuns: as doenças periodontais e a cárie dentária (Wade, 2013). Entretanto, a presença desses micro-organismos não configura um estado de doença, pois participam diretamente e indiretamente de diversas reações de desenvolvimento de nutrição, fisiologia e sistema de defesa do ser humano. Para que haja condição de doença é dependente da quantidade de microrganismos, seus fatores de virulência e o sistema imunológico do hospedeiro (Gomes, 1995, 2002).

De acordo com Dabdoub (2016), a composição da microbiota oral é mais generalista em situação de saúde, enquanto em estado de doença, são influenciados por micro-organismos especializados, com maiores fatores de virulência e capacidade de permanência, podendo influenciar doenças crônicas, geralmente de progressão lenta, como a doença cárie. Toda essa comunidade pode entrar em desequilíbrio através de mudanças do fluxo salivar, temperatura, variação no pH, mudanças da dieta, podendo ocasionar prejuízos (Marsh 1994, 2006; Sheiham e James, 2015).

Em condições de normalidade, o esmalte e o cemento atuam como uma barreira impermeável contra à entrada de micro-organismos, protegendo a progressão para o complexo dentina-polpa (Hirsch et al., 2017). Porém, em um ambiente disbiótico, bactérias comensais na forma de biofilmes orais, produzem ácidos, a partir do processo de fermentação, que são capazes de dissolver a hidroxiapatita do esmalte e da dentina, levando à formação de cárie dentária (Marsh, 1994). Com o avanço dessa infecção os microrganismos e seus subprodutos avançam em direção a polpa, percorrem nos túbulos dentinários e propagam-se por todo o sistema de canais radiculares, incluindo ramificações, istmos e deltas apicais (Nair, 1987; Baumgartner e Falkler, 1991; Sjögren et al., 1991), causando um processo inflamatório.

Conforme os estudos realizados por Kakehashi et al. (1966), ratos gnotobióticos deixados com exposição pulpar não apresentaram alterações patológicas perirradiculares em radiografias e a polpa permaneceu vital. Entretanto, quando contaminados pela flora normal de outros animais, o quadro clínico observado foi de necrose pulpar e periapicopatias. O estudo citado demonstra a grande participação dos microrganismos no processo inflamatório pulpar, que pode ser classificado como pulpíte reversível e irreversível, onde a primeira pode voltar ao quadro de saúde após a remoção do estímulo causal, e a segunda caracterizada pela exposição do tecido pulpar aos microrganismos, sendo necessário a realização do tratamento endodôntico para remoção dos sinais e sintomas (Levin et al., 2009; Ricucci et al., 2014; Rôças et al.; 2015, 2016).

As infecções endodônticas são caracterizadas por uma infecção polimicrobiana, com presença de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Gomes et al., 2015; Aveiro et al., 2020; Louzada et al., 2020; Barbosa-Ribeiro et al., 2016, 2019, 2021; Arruda-Vasconcelos et al., 2021). Essas bactérias, possuem diferentes fatores de virulência capazes de prolongar a infecção endodôntica, podendo ter associações entre bactérias Gram-negativas, formando combinações de diferentes LPS e potenciais inflamatórios, e união entre Gram-positivas e Gram-negativas, associando os LTA das Gram-positivas aos LPS das Gram-negativas, aumentando o potencial de ambas (Jiang et al., 2003; Fouad, 2009; Martinho, 2011; Gomes et al., 2013). Esses fatores de virulência estão associados a quadros de dor espontânea, sensibilidade à palpação e percussão, assim como reabsorção óssea, já que através da liberação, são capazes de induzirem um processo inflamatório no hospedeiro (Gomes et al., 2012, 2013; Jacinto et al., 2005).

A literatura explorou extensivamente aspectos microbiológicos em dentes que apresentam infecção endodôntica de longa data, com polpas necróticas e periapicopatias. Contudo, ainda são necessários estudos sobre os estágios iniciais da infecção endodôntica, pois esses aspectos podem ter sido subestimados. Portanto, o objetivo deste estudo clínico foi analisar comparativamente os níveis de bactérias cultiváveis, endotoxinas, e ácido lipoteicóico em dentes com pulpíte irreversível sintomática e polpa normal.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Polpa dental e principais vias de contaminação

A polpa dentária é um tecido amplamente vascularizado e innervado, envolvido por sólidas paredes de dentina. Possui mecanismo de defesa contra microrganismos, através de células fagocitárias e anticorpos. A simples presença de microrganismos invasores não configura um estado de doença, pois esse estado é determinado pela quantidade de agentes invasores, fatores de virulência e capacidade do sistema de defesa do hospedeiro (Gomes, 1995; Gomes et al., 2013).

Com o rompimento das barreiras físicas que protegem o complexo dentino-pulpar, esmalte e cimento, a polpa pode sofrer invasões de microrganismos capazes de induzirem o processo inflamatório. A principal via de acesso é caracterizada pela exposição dos túbulos dentinários, ou da própria cavidade pulpar em decorrência do processo de cárie ou fraturas coronárias. Todavia, outras vias de infecção também foram citadas, como a via anacorética, canais laterais de dentes com periodontite e procedimentos restauradores (Siqueira Jr. et al., 2012).

2.2 Relação de microrganismos e infecções pulpares

Segundo Estrela et al.,1997, Van Leeuwenhoek, em 1697, detectou pequenas formas de vida, através de suas lentes de aumento, presentes na saliva e em materiais provenientes de processos cariosos. Anos mais tarde, o pesquisador francês Louis Pasteur (1861), ficou conhecido por descobrir as bactérias, porém não analisou o papel destes microrganismos em infecções clínicas, sendo este estudo realizado por Veillon e Zuber em 1898. Existe uma relação direta entre a presença de microrganismos e as patologias ocorridas na polpa dental, segundo Miller (1894). O autor foi o primeiro pesquisador que através da análise de esfregaços obtidos de canais radiculares, câmara pulpar aberta e polpas necróticas, detectou a presença de bactérias e as descreveu determinando formas (cocos, espirilos e bacilos), e observou diferenças entre as localizadas no interior do canal radicular e as da câmara pulpar.

Épocas mais tarde, Kakehashi et al., em 1966, realizaram um experimento no qual promoveram exposição pulpar ao meio bucal de ratos gnotobióticos e observaram que não houve alterações patológicas perirradiculares nas radiografias. A polpa permaneceu vital e iniciou-se um processo de reparação pulpar com formação de pontes de osteodentina. Com isso, os autores validaram o potencial de reparação pulpar na ausência de infecção. Por outro lado, quando o experimento foi realizado em ratos convencionais (presença de microrganismos), o quadro clínico observado foi de necrose pulpar e periapicopatias.

A necrose pulpar e o desenvolvimento de lesões periapicais têm como agente etiológico primário os microrganismos e seus subprodutos, sendo esses representados principalmente por bactérias (Kakehashi et al., 1966; Moller et al., 1981; Bonifácio, 2000; Peters et al., 2002; Wade, 2013), o que torna fundamental a eliminação para o sucesso do tratamento endodôntico. Portanto, os insucessos desses tratamentos possuem uma relação direta com a dificuldade do controle e eliminação da infecção endodôntica nos canais radiculares (Gomes et al., 2004).

A microbiota oral abriga uma grande diversidade de microrganismos, incluindo fungos, leveduras, arqueas, vírus, protozoários, e em maior quantidade, as bactérias (Wade, 2013; Gomes et al., 2015). Os fatores de virulência das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas são associados à estimulação da resposta inflamatória do hospedeiro causando danos à polpa e aos tecidos perirradiculares (Ginsburg, 2002; Barbosa-Ribeiro et al., 2016a; Martinho et al., 2017).

2.3 Bactérias Gram-negativas e endotoxinas

As bactérias Gram-negativas possuem um fator de virulência exclusivo entre as demais, dispendo de uma membrana externa em sua parede celular, denominada de endotoxina, ou lipopolissacarídeo (LPS) (Gomes et al., 2009). Esse fator de virulência pode ser liberado através da lise ou divisão celular, sendo capaz de desencadear uma cascata de eventos biológicos, resultando em um intenso processo inflamatório e reabsorção dos tecidos ósseos (Khabbaz et al., 2001; Beutler, 2004). Basicamente, essa estrutura é dividida em três componentes específicos: Lípide A, parte hidrofóbica que se adere às membranas bacterianas; O

centro (core), um polissacarídeo, composto por vários açúcares; e a parte mais variável da molécula, o antígeno O, que localiza-se do lado de fora da cadeia, sendo hidrofílico (Rietschel e Brade, 1992; Raetz e Whitfield, 2002).

Ao Lipíde A é atribuída a toxicidade da endotoxina, induzindo respostas imunológicas específicas (Rietschel e Brade, 1992). Essa porção pode variar de espécie para espécie e entre diferentes cepas da mesma espécie (Dixon e Darveau, 2005; Reife et al., 2006). O core, ou porção central, varia pouco em sua constituição entre as espécies, e tem capacidade de induzir a formação de anticorpos (Rietschel e Brade, 1992). A maior parte da molécula, e também a mais variável, é formada pelo antígeno O, que induz resposta imunológica específica por intermédio da produção de anticorpos específicos, além de proteger a célula contra a ação de substâncias hidrofóbicas (Luderitz et al., 1981; Rietschel e Brade, 1992).

Esse fator de virulência, assim como os das bactérias Gram-positivas (LTA), não lesam diretamente o tecido pulpar, pois a ação de ambos é indireta pela ativação da resposta imune do hospedeiro, causando prejuízos (Fouad, 2009; Gomes et al., 2013). Importante salientar que a endotoxina, mesmo em baixas concentrações, tem potencial para ativação da resposta inata do sistema imune (Hong, 2004).

2.3.1 Detecção e quantificação de LPS

Para detecção do LPS, usualmente utiliza-se o *Limulus ameobocyte lysate* (LAL), que atende as especificidades e é considerado de alta sensibilidade para percepção da molécula (Kuppermann, 1994). Esse método possui a capacidade de quantificar pequenas concentrações de LPS, sendo muito utilizado para estudos sobre os canais radiculares infectados (Jacinto et al., 2005; Vianna et al., 2007; Martinho e Gomes 2008; Martinho et al., 2011; Endo et al., 2012). O teste consiste em uma reação entre o componente protético do LAL e o LPS, e posteriormente, se existir a formação de um gel opaco, conclui-se que existe a presença de endotoxina na amostra. Para a detecção e quantificação do lipopolissacarídeo, o teste utiliza corantes sintéticos que permitem, através do leitor de Elisa, a detecção cromogenicamente (Kuppermann, 1994).

Diversos pesquisadores utilizaram esse método de identificação para estudos de correlação entre infecções endodônticas e as endotoxinas. Jacinto et. al. (2005) investigaram analisaram os níveis de LPS em canais radiculares com polpa necrosada e as possíveis relações correlações com os sinais e sintomas presentes pacientes voluntários. Para quantificação da endotoxina foi utilizado o teste LAL. Os autores concluíram que existe associação entre sintomatologia dolorosa e a presença de endotoxinas nos canais radiculares com quadro de necrose pulpar.

2.4 Cultura microbiana e métodos moleculares

O método de cultura visa conseguir crescer e identificar em laboratório os microrganismos presentes em um determinado ambiente, proporcionando nutrientes, umidade, temperatura, pH, condições atmosférica e requerimentos gasosos ideais, entre outros (Siqueira Jr e Roças, 2005). Basicamente, após a coleta da amostra, esta é transportada e processada nos laboratórios através da diluição, cultivo, isolamento, e por fim identificação.

Na endodontia, as amostras são coletadas e transportadas em um meio pré-reduzido para o laboratório, sendo a seguir dispersas, e inoculadas em meio de culturas específicos, como por exemplo o Meio ágar anaeróbico fastidioso (FAA- *Fastidious Anaerobe Agar*); e o meio ágar Brain Heart Infusion (BHI), para depois serem cultivadas em condições anaeróbicas e facultativas, respectivamente. Com o tempo ideal de incubação e crescimento, as colônias passam pelo processo de identificação, tendo como base, os aspectos fenotípicos, morfologia das células e colônias, coloração do tipo Gram (diferenciando Gram-positivas e Gram-negativas), características bioquímicas, e tolerâncias ao oxigênio (Siqueira Jr e Roças, 2005; Cohen e Hargreaves, 2011).

Esse método de crescimento bacteriano tem como vantagem a detecção de diferentes espécies, permitindo realizações de testes laboratoriais referente à suscetibilidade de microrganismos, além das análises fisiológicas das cepas microbianas (Siqueira Jr e Roças, 2005). Todavia, como desvantagem pode-se destacar a impossibilidade de cultivo de todas as espécies, pois nem todas bactérias conseguem sobreviver, ser recuperadas. Além disso, o método necessita de dias

e/ou semanas para a identificação dos microrganismos estudados (Siqueira Jr e Roças, 2005; Cohen e Hargreaves, 2011).

Por conta das limitações do método de cultura, modelos de sequenciamento de ácidos nucleicos foram sugeridos a fim de abranger maiores detalhes dos microrganismos (Roças et al., 2004), como por exemplo, a Polymerase Chain Reaction (PCR) que não tem como requerimento a viabilidade da bactéria, detectando as espécies até em baixas proporções, não necessitando de amplificação do DNA para a identificação do microrganismo (Socransky et al., 1994).

Muitos estudos associam o uso dos dois métodos, cultura e método molecular, pois a cultura possui baixa sensibilidade e detecta grande quantidade de espécies, e os modelos moleculares, são mais sensíveis e específicos, além da maioria possuir uma espécie-alvo de identificação (Cohen e Hargreaves, 2011).

2.5 Bactéria Gram-positiva e o ácido lipoteicóico

As bactérias Gram-positiva possuem como fator de virulência, uma exotoxina repleta de ácido lipoteicóico (LTA), que lhes conferem aderência à superfície dental, através da dissolução da hidroxiapatita (Ciardi et al., 1977; Bhakdi et al., 1991; Hahn e Liewehr, 2007; Yoo et al., 2019).

A molécula de peptideoglicano, presente em maior quantidade nesse tipo de bactéria, é um fator pró-inflamatório e assim como o LPS, essa molécula não atinge diretamente o tecido pulpar, mas através da ativação de resposta imune do hospedeiro (Fouad, 2009; Gomes et al., 2013). Possuem a capacidade de estimular monócitos, leucócitos e macrófagos para liberação de mediadores inflamatórios (Ginsburg, 2002).

A presença de bactérias Gram-positivas (estritas ou facultativas) tem sido associada ao insucesso do tratamento endodôntico, assim como resistência a desinfetantes e antibióticos (Signoretto et al., 2000; Zhao et al., 2013). Esse tipo de microrganismo tem capacidade para se moldar em situações para sobreviver com insuficiência de nutrientes, além de condições rigorosas, como o canal radicular previamente tratado endodonticamente. Dentre os mais resistentes tem-se:

Enterococcus faecalis, *Streptococcus* spp., *Actinomyces* spp. e *Aerococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Gamella* spp. (Gomes et al., 2009; Rôças et al., 2008; Barbosa-Ribeiro et al., 2016b).

O ácido lipoteicóico é um fator de virulência bacteriano muito estudado por estar associado ao insucesso dos tratamentos endodônticos. Em uma investigação clínica, Arruda-Vasconcelos et al., 2021, selecionaram 10 pacientes com necessidade de tratamento endodôntico, coletando amostras de duas regiões distintas: dentina infectada e canal radicular; e em três momentos: antes do tratamento, após o preparo químico mecânico e após a medicação intracanal. Foi concluído que os níveis de LTA foram menores após a medicação intracanal quando comparados aos níveis iniciais e após o preparo químico mecânico.

3 PROPOSIÇÃO

São objetivos do presente estudo:

Objetivo Geral:

Investigar os níveis de bactérias cultiváveis e fatores de virulência em dentes com polpa normal e pulpíte irreversível sintomática.

Objetivos específicos:

- a) Investigar os níveis de bactérias cultiváveis em canais radiculares de dentes com polpa normal e pulpíte irreversível sintomática através da técnica de cultura microbiana.
- b) Quantificar os níveis de endotoxinas em canais radiculares de dentes com polpa normal e pulpíte irreversível sintomática através do método turbidimétrico LAL pyrogent 5000.
- c) Quantificar os níveis de ácido lipoteicóico em canais radiculares de dentes com polpa normal e pulpíte irreversível sintomática através do teste de ELISA.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Autorização para realização da pesquisa

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (protocolo número CAAE 86140218.0.0000.5418) da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Piracicaba, SP, Brasil. Todos os pacientes assinaram um termo de consentimento informado antes de sua participação. O registro dos casos incluídos nesta investigação encontra-se no Registro Brasileiro de Ensaio Clínicos (ReBEC; UTN U1111-1238-5402).

4.2 População de estudo

Para realização do presente estudo, foram selecionados dois grupos de pacientes que buscaram atendimento odontológico na Faculdade de Odontologia de Piracicaba (UNICAMP) para tratamento endodôntico: aqueles com polpa vital e pulpite irreversível sintomática e aqueles com polpa vital normal (saudável). Um total de 30 indivíduos foram incluídos na análise: 20 no grupo de pulpite irreversível sintomática e 10 no grupo de polpa saudável (controle).

Para o diagnóstico de pulpite irreversível usou-se como base a Conferência de Consenso da Associação Americana de Endodôntica sobre Terminologia de Diagnóstico (Levin et al., 2009). Os grupos de pulpite irreversível sintomática compreendiam dentes com presença de lesões cáries profundas, dentes com polpa vital permitindo o isolamento adequado com um dique de borracha, resposta prolongada e exacerbada ao teste de frio usando 1,1,1,2 tetrafluoroetano (Endo-Ice, Hygenic Corp., Akron, OH, EUA) por mais de 30 segundos, resposta positiva ao teste elétrico (Odous De Deus, Belo Horizonte, MG, Brasil) e sangramento na cavidade de acesso. O grupo de polpas saudáveis (PN) era formado por dentes com polpas vitais sem restauração e com necessidade de tratamento endodôntico por motivos protéticos.

Dentes obturados, dentes com polpas necróticas checadas por frio e / ou

elétrico, presença de trincas, dentes sem isolamento, dentes com lesão periapical evidenciada radiograficamente, dentes com bolsa periodontal com profundidade maior que 3 mm não foram incluídos na investigação. Indivíduos que receberam qualquer intervenção ou que foram submetidos a analgésicos antes do tratamento endodôntico, voluntários tomando medicamentos conhecidos por influenciar na resposta imune, em tratamento com antibióticos nos últimos 3 meses e relatando doença sistêmica, foram excluídos do estudo.

4.3 Procedimento de descontaminação

Para realização da coleta de amostras clínicas utilizou-se como base estudos anteriores (Louzada et al. 2020; Arruda-Vasconcelos et al., 2021). Previamente à intervenção, o paciente foi submetido à uma descontaminação da pele facial com solução de clorexidina 2% (Drogal, Piracicaba, SP, Brasil). Após esse procedimento, os dentes receberam anestesia localmente com lidocaína a 2% e epinefrina a 1: 100.000, e posteriormente foram isolados com dique de borracha para o isolamento absoluto.

Com o intuito de desinfecção da área, foi realizado um protocolo na coroa do dente, campo operatório e nas estruturas adjacentes, utilizando 30% de peróxido de hidrogênio, H₂O₂ (v / v), por 30 segundos, seguido de 2,5% de hipoclorito de sódio, NaOCl (30 segundos), e para finalizar, neutralização com 5% de tiosulfato de sódio. A validação da desinfecção foi adquirida através da retirada de uma amostra de esfregaço das superfícies interna e externa da coroa dentária e das estruturas circundantes. A amostra de esfregaço foi semeada em uma placa contendo 5% de sangue de ovelha desfibrinado e ágar anaeróbico fastidioso (FAA - LAB M, Heywood, Lancashire, UK) e ágar Brain Heart Infusion (BHI - LAB M, Heywood, Lancashire, UK) antes de ser incubado anaerobicamente e aerobicamente, respectivamente, por até 14 dias (Louzada et al. 2020; Arruda-Vasconcelos et al., 2021). Sob protocolos específicos, o material genético foi extraído da amostra de swab, e esse DNA foi levado para análise de reação em cadeia de polimerase (PCR), utilizando primers bacterianos universais. Em caso de cultura positiva ou presença de produto de amplificação de DNA, o paciente era excluído do estudo clínico.

4.4 Coleta de amostra e tratamento endodôntico

Todos os procedimentos foram realizados em condições rigorosamente assépticas. Iniciando pelo preparo cavitário, o acesso foi realizado em duas etapas com o uso de broca esférica diamantada estéril em alta rotação e a irrigação do equipo desconectada. A irrigação foi realizada manualmente com água destilada estéril e seringa. A primeira etapa teve como propósito a remoção dos principais contaminantes, enquanto a segunda etapa envolveu a desinfecção, cujo protocolo foi repetido conforme descrito acima antes do acesso à câmara pulpar.

Em todos os atendimentos utilizou-se microscópio operatório (DF Vasconcellos S / A, São Paulo, SP, Brasil). Logo após a remoção do tecido pulpar, o comprimento de trabalho foi determinado radiograficamente e confirmado com um localizador foraminal eletrônico (Novapex, Forum Technologies, Rishon le Zion, Israel) e uma lima do tipo K (tamanho 20, Dentsply Sirona, Ballaigues, Suíça) foi utilizada para patência apical, permitindo a inserção das pontas de papel absorvente para coleta da amostra periapical, após extirpação completa dos tecidos pulpare.

Para análise do LPS, a coleta da amostra do canal radicular foi através de ponta de papel estéril apirogênica (tamanho 20, Cell Pack; Dentsply Sirona, Ballaigues, Suíça), imobilizando-a na posição por 1 minuto. Posteriormente, foram colocados em tubo criogênico estéril e congelados a -80 °C para ensaio de LAL Pyrogent 5000. Com o intuito de análise microbiológica, três pontas de papel estéril (tamanho 20, Cell Pack; Dentsply Sirona, Ballaigues, Suíça) foram introduzidas uma de cada vez em todo o comprimento do canal radicular e imobilizadas na posição por 1 minuto. Essas pontas de papel foram colocadas em tubos esterilizados contendo 1 mL de meio de transporte (VMGA III) e imediatamente processadas para cultura microbiana. Por fim, para coleta da amostra de ácido lipoteicóico, duas pontas de papel estéril (tamanho 20, Cell Pack; Dentsply Sirona, Ballaigues, Suíça) foram inseridas nos tecidos periapicais (2 mm além o ápice) e imobilizadas na posição por 1 minuto, em seguida, foram removidas e colocadas em um criotubo estéril e congeladas a -80 °C até serem quantificadas em análises de ELISA.

O tratamento endodôntico foi realizado com limas Reciproc R25 e R40 (VDW, Munique, Alemanha), em movimento recíprocante gerado a partir de um

motor elétrico (VDW Silver, Munique, Alemanha). Tais limas foram utilizadas em um movimento de bicada, de inserção e remoção, (amplitude de aproximadamente 3 mm) com leve pressão apical. Após três movimentos de bicada, a lima foi removida do canal radicular e limpa em gaze estéril. Para confirmação da patência, foi inserido manualmente uma lima do tipo K de tamanho 20, em todo comprimento de trabalho. Este mesmo protocolo foi repetido até que o instrumento Reciproc atingisse o comprimento de trabalho (exibição de zero no localizador apical).

Previamente à introdução de cada instrumento, utilizou-se seringa (agulha 27-G) com gel de clorexidina 2% em todo canal radicular. Logo após o uso de cada instrumental, 5 mL de solução fisiológica foi aplicado para remoção do debris gerados a partir da instrumentação. Ao final da instrumentação, uma solução contendo 5 mL de Tween-80 a 5% e 0,07% (p / v) de lecitina (Drogal, Piracicaba, SP, Brasil) foi utilizada para a neutralização da clorexidina. O enxágue final foi realizado com 3 mL de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 17% ativado por ultrassom (3 ciclos de 20 segundos) por meio de aparelho ultrassônico (Satelec / Acteon, Mount Laurel, NJ, EUA) com ponta Irrisonic E1 (Helse Ultrasonic, Santa Rosa de Viterbo, SP, Brasil) e 10 mL de solução salina estéril para eliminação do EDTA.

Em seguida, os canais radiculares foram secos com pontas de papel estéreis e obturados com técnica do cone único de guta-percha Reciproc e cimento endodôntico (Endométhasone N, Septodont, Saint-Maur-des-Fossés, França). A cavidade de acesso foi selada com cimento provisório de 2 mm de espessura (Cimpat, Septodont, Saint-Maur-des-Fossés, França), seguido de resina composta fotopolimerizável (Filtek Z350 XT, 3M Dental Products, St Paul, MN, EUA) em combinação com um adesivo de ligação simples (3M Dental Products, St Paul, MN, EUA).

4.5 Procedimentos laboratoriais

4.5.1 Cultura microbiana

A contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) foi baseada em estudos anteriores (Barbosa Ribeiro et al., 2019; Aveiro et al., 2020). Os tubos contendo as amostras de canal radicular e meio VMGA III foram transferidos em 15 minutos para uma câmara anaeróbica (Don Whitley Scientific, Bradford, Reino Unido) para análise de cultura microbiana. Esses tubos foram agitados por 1 minuto (Vórtex; Marconi, Piracicaba, São Paulo, Brasil) e, em seguida, diluições seriadas de 10 vezes foram realizadas até 10^{-4} em tubos contendo FAB (*Fastidious Anaerobe Broth*) (Lab M, Bury, Reino Unido). Cinquenta μL de cada diluição seriada foram plaqueados em FAA (*Fastidious Anaerobe Agar*) (LAB M, Bury, Reino Unido) + 5% de sangue de carneiro desfibrinado utilizando alças plásticas estéreis. As placas foram incubadas anaerobicamente a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por até 14 dias. Após esse período, as UFCs foram quantificadas visualmente em cada placa.

4.5.2 Análise dos níveis de endotoxinas

A quantificação dos níveis de LPS foi realizada de acordo com estudos anteriores (Aveiro et al., 2020; Louzada et al., 2020; Arruda-Vasconcelos et al., 2021). O teste turbidimétrico (Bio Whittaker, Inc., Walkersville, MD, EUA) foi utilizado com limite de detecção do ensaio LAL de 0,01-100 EU / mL para quantificação das concentrações de LPS nos dentes com diagnóstico de pulpíte irreversível e dentes com polpa normal. Uma curva padrão foi determinada usando o LPS fornecido no kit em uma concentração conhecida, ou seja, 100 EU / mL e então usada para calcular a concentração de LPS em cada amostra coletada. As concentrações de LPS na curva padrão foram 0,01, 0,10, 1 e 10 EU / mL, de acordo com as recomendações do fabricante. O software calcula os valores de LPS para correção do fator de diluição. As reações foram realizadas em duplicata para validação do teste. Uma microplaca de 96 poços (Corning Costar, Cambridge, MA, EUA) foi incubada em um bloco de aquecimento ajustado a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante todo o experimento. Inicialmente, as amostras foram suspensas em 1 mL de água reagente LAL (fornecida com o kit),

agitadas em um misturador vórtex por 1 minuto e diluídas até 10^{-1} . Cem μL da solução “branco” mais soluções LPS padrão nas concentrações descritas acima, junto com 100 μL de cada amostra, foram adicionados em duplicata aos poços da microplaca de 96 poços.

O teste foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. Os níveis de LPS foram medidos individualmente usando um leitor de placas ELISA (Ultramark, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, EUA) operando a uma absorvância de 340 nm. O valor médio de absorvância das soluções padrão foi diretamente proporcional à concentração de LPS, com a concentração de LPS desconhecido sendo determinada a partir da curva padrão.

4.5.3 Análise dos níveis de ácido lipoteicóico

Para quantificar os níveis de ácido lipoteicóico foi utilizado como base ensaios descritos em estudos anteriores (Barbosa-Ribeiro et al., 2016a; Aveiro et al., 2020; Louzada et al., 2020; Arruda-Vasconcelos et al., 2021). Foi utilizado o método ELISA (My BioSource, San Diego, CA, EUA). As soluções padrão, controle e amostras foram adicionados a uma placa de 96 poços, que havia sido pré-revestido com o anticorpo monoclonal específico para LTA fornecido pelo fabricante. Anticorpos anti-LTA marcados com biotina foram adicionados para ligar-se à estreptavidina conjugada com estreptavidina-HRP, formando assim um complexo imunológico. A placa foi incubada por 1 h a 37 °C e depois lavada para remoção de enzimas. Uma solução de substrato contendo peróxido de hidrogênio e cromogênio foi adicionada à reação. Os níveis de LTA foram quantificados por uma placa leitora de ELISA com uma absorvância definida em 450 nm e o ensaio foi normalizado para valores de controle negativo. Cada valor densitométrico, expresso como média e desvio padrão, foi obtido a partir de dois experimentos independentes.

4.5.4 Análise estatística

O tamanho da amostra foi calculado com um poder de 80% ($\beta = 0,20$), indicando um mínimo de 10 dentes por grupo para mostrar uma diferença de 5% ($\alpha = 0,05$) entre os grupos de acordo com Cohen (1988). Portanto, 20 dentes foram

incluídos no grupo de pulpíte irreversível sintomática e 10 dentes no grupo de polpa saudável. Os cálculos foram feitos por meio do software G*Power 3.1.9.7 para Windows. O software SPSS para Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA) foi utilizado para a realização da análise estatística. O teste de Mann-Whitney foi usado para comparações entre os diferentes grupos (pulpíte irreversível sintomática e polpa normal) em relação aos níveis de bactérias cultiváveis (UFC/mL). Análise de variância ANOVA foi usada para comparação de LPS e LTA entre os dois grupos. O nível de significância foi estabelecido em 5% em todos os testes ($P < 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 Características clínicas

A idade média dos pacientes nos grupos de pulpíte irreversível sintomática foi de 37,30 (\pm 8,93), enquanto no grupo de polpa saudável foi de 54,30 (\pm 10,68). A maioria dos pacientes incluídos no estudo era do sexo feminino, sendo 17/20 no grupo de pulpíte irreversível sintomática e 6/10 no grupo de polpa saudável).

Entre os voluntários com pulpíte irreversível sintomática foram selecionados 15 dentes molares (8 superiores e 7 inferiores), 4 pré-molares (3 superiores e 1 inferior) e 1 canino superior. No grupo de polpa saudável, os dentes eram 1 molar inferior, 3 pré-molares (2 superiores e 1 inferior), 4 caninos (1 superior e 3 inferiores) e 2 incisivos superiores.

No grupo de pacientes com polpa normal, os pacientes não apresentavam sintomatologia dolorosa, ao contrário do outro grupo pulpíte irreversível sintomática que apresentavam dor espontânea.

No grupo pulpíte irreversível sintomática, 8/20 dentes apresentaram cárie e 12/20 estavam restaurados e com cárie secundária.

5.2 Contagem de UFC

Em todas as amostras coletadas de dentes com diagnóstico de pulpíte irreversível, houve crescimento bacteriano, com valor médio de $3,9 \times 10^2$ UFC/mL. Por outro lado, em dentes com polpa normal, não ocorreu cultura positiva. Os níveis de bactérias cultiváveis em dentes com pulpíte irreversível sintomática foram significativamente maiores do que em dentes com polpas saudáveis ($P < 0,05$) (Tabela 1).

Tabela 1 - Níveis de bactérias cultiváveis (UFC/mL) em dentes com pulpíte irreversível e polpa normal.

Diagnóstico Pulpar		
Coleta clínica	Pulpíte irreversível	Polpa normal
Baseline	$3,9 \times 10^2$ $(1,9 \times 10^2 - 6,4 \times 10^2)^*$	0 $(0 - 0)$

Asterisco (*) significa diferença estatística entre o grupo pulpíte irreversível e polpa normal através do teste de Mann-Whitney.

5.3 Níveis de LPS

Endotoxinas foram detectadas em todos os canais radiculares de dentes com pulpíte irreversível. Os níveis de LPS foram, aproximadamente, 4 vezes maiores em dentes com pulpíte irreversível sintomática do que em dentes com tecidos pulparem normais ($p < 0,05$) (Figura 1).

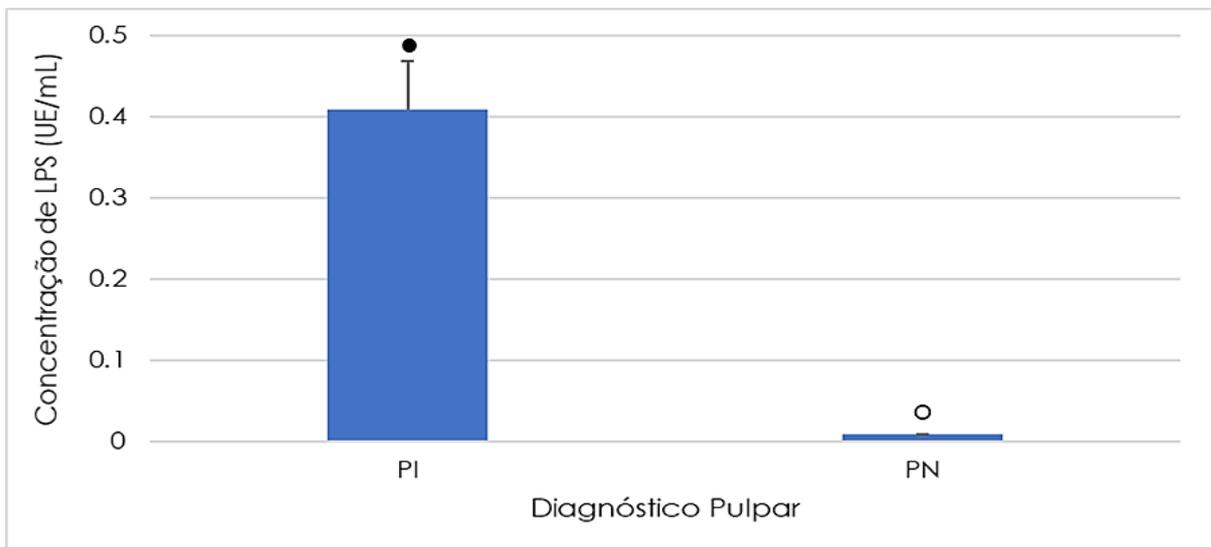


Figura 1 -. Média (\pm DP) dos níveis de endotoxinas (UE/mL) em dentes com pulpíte irreversível e polpa normal.

5.4 Níveis de LTA

Maiores níveis de LTA foram encontrados em dentes com pulpite irreversível quando comparados a dentes com polpa normal. ($P < 0,05$). (Figura 2).

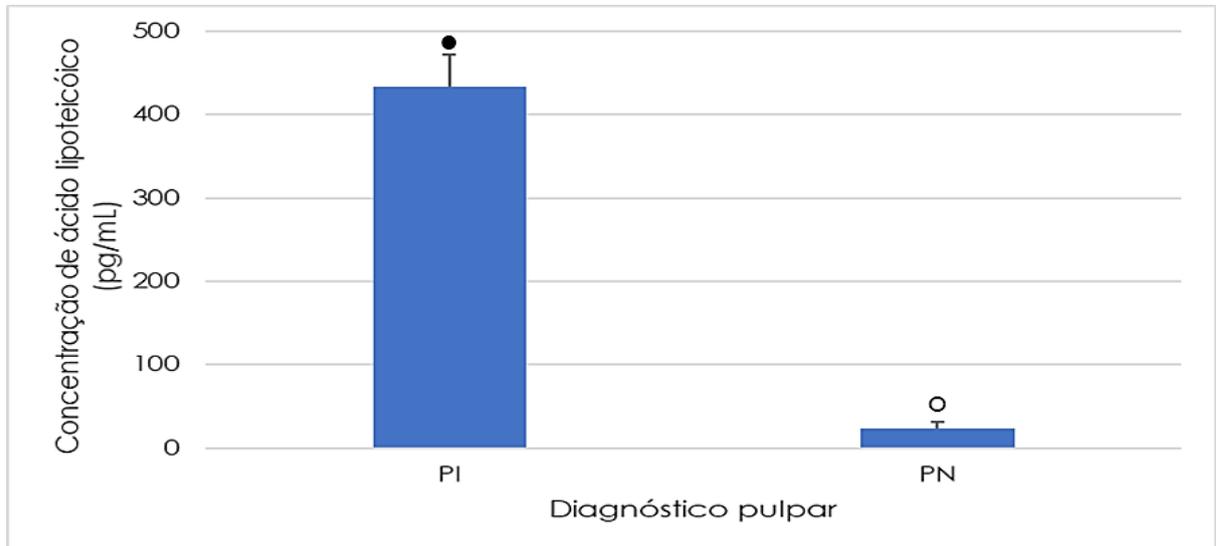


Figura 2 - Média (\pm DP) dos níveis de ácido lipoteicóico (pg/mL) em dentes com pulpite irreversível e polpa normal.

6 DISCUSSÃO

A literatura conta um grande acervo de estudos que investigaram a patogenicidade em diferentes situações clínicas, isto é, infecções endodônticas primárias, secundárias e persistentes. (Jacinto et al., 2005; Gomes et al., 2015; Cavalli et al., 2017; Barbosa Ribeiro et al., 2019; Aveiro et al., 2020; Machado et al., 2020). Contudo, são limitados os conteúdos sobre estágios iniciais da infecção pulpar. Portanto, o objetivo principal deste estudo foi analisar comparativamente os níveis de endotoxinas, bactérias cultiváveis, e ácido lipoteicóico no canal radicular e tecido periapical de dentes com pulpite irreversível sintomática e polpas saudáveis.

De maneira geral, nossos resultados mostram que dentes com pulpite irreversível apresentaram maiores níveis microbianos, bem como de seus fatores de virulência. Isto se mostra interessante, uma vez que este estudo evidenciou os níveis de bactérias, LPS e LTA capazes de causar danos irreversíveis ao tecido pulpar.

A microbiota dos dentes com pulpite irreversível é polimicrobiana, abrigando espécies Gram-positivas e Gram-negativas (Arruda-Vasconcelos et al., 2021). A endotoxina é o principal constituinte da membrana externa das bactérias Gram-negativas, sendo exclusiva desses microrganismos, secretada em vesículas durante a multiplicação ou morte celular (Rietschel e Brade, 1992). O LPS foi extensivamente investigado como o fator de virulência microbiana mais relevante envolvido na ativação de células imunocompetentes e levando à liberação de uma variedade de mediadores pró-inflamatórios, ativando resposta inata do sistema de defesa do hospedeiro e acionando uma cascata de eventos biológicos, envolvendo inflamação e reabsorção de tecidos mineralizados (Mattison et al., 1987; Beutler e Poltorak 2000; Hong et al., 2004).

Em relação aos aspectos microbianos investigados neste estudo, o número de unidades formadoras de colônia (UFC) foi significativamente maior nos dentes com pulpite irreversível sintomática do que nos dentes com polpa saudável. A microbiota dos dentes hígidos foi pouco investigada. No entanto, um estudo recente detectou bactérias em 100% das amostras coletadas em dentes hígidos, porém sem distinguir se esses microrganismos estão viáveis ou não (Widmer et al., 2018;

Chiarelli-Neto, 2019) em sua dissertação de mestrado não observou bactérias viáveis em dentes com polpas normais, mas detectou níveis de fatores de virulência LPS e LTA, concluindo que bactérias podem estar presentes em polpas normais.

Nesse contexto, o método de cultura microbiana permite o crescimento de bactérias *in vitro*, mas a sensibilidade da cultura microbiana é aproximadamente 10^4 - 10^5 células para espécie-alvo, utilizando meios não seletivos, e 10^3 células com o uso de meios seletivos (Gadê et al., 2019).

Por outro lado, os achados deste trabalho sugerem que 10^2 UFC/mL nos canais radiculares é um potencial indicativo da quantidade de bactérias viáveis que causam danos irreversíveis aos tecidos pulpares. É importante ressaltar que o fator etiológico mais comum para a inflamação pulpar é a cárie (Roças et al., 2015, 2016). Estudos anteriores revelaram que o número de UFC/mL na lesão de cárie é em torno de 10^5 (Damle et al., 2016). O número comparativo de bactérias entre a lesão de cárie e os canais radiculares é notório; porém, é importante destacar que alguns fatores como pH, temperatura, disponibilidade de nutrientes, entre outros (Narayanan e Vaishnavi, 2010) estão relacionados à seleção microbiana e, conseqüentemente, devem ser menores nos canais radiculares.

O estudo apresentado, revelou maiores níveis de endotoxinas em dentes com pulpite irreversível sintomática em comparação com os dentes com polpas normais. Além disso, outros estudos realizados em dentes com polpas vitais mostraram o envolvimento de espécies Gram-negativas (Duque et al. 2019; Louzada et al., 2020). Os LPS estão associados a quadros de dor espontânea, sensibilidade à palpação e percussão, assim como reabsorção óssea, já que através de sua liberação, são capazes de induzirem um processo inflamatório no hospedeiro (Jacinto et al., 2005; Gomes et al., 2012, 2013). No entanto, os níveis de LPS detectados neste estudo são mais baixos em comparação com os dentes de infecção endodôntica primária e evidência radiográfica de lesão periapical (Jacinto et al., 2005; Aveiro et al., 2020) e infecção endodôntica secundária (Endo et al., 2012, Gomes et al., 2021). Estudos anteriores detectaram a presença de endotoxinas em 100% dos casos de dentes com infecções primárias e lesões periapicais, além de detecção em casos de insucesso do tratamento (Martinho e Gomes, 2008; Gomes et al., 2012). Com o presente estudo, podemos inferir a participação do LPS também nos estágios iniciais

da infecção endodôntica conforme descrito anteriormente (Arruda-Vasconcelos et al., 2021).

O ácido lipoteicóico, é o principal fator de virulência das bactérias Gram-positivas. Essa exotoxina participa da formação do biofilme e possui como característica a adesão ao dente, através da adsorção da hidroxiapatita (Ginsburg, 2002). Por suas características, está muito relacionado aos casos de insucesso do tratamento endodôntico, sendo associado a resistência de medicações intracanaís. Assim como as endotoxinas das bactérias Gram-negativas, o LTA também possui como característica a capacidade da ativação do sistema imune do hospedeiro (Signoretto et al., 2000; Fouad, 2009; Gomes et al., 2013; Zhao et al., 2014). No presente estudo, através do teste de ELISA, foi possível observar maiores concentrações de LTA em dentes com quadro de pulpíte irreversível, se comparado com os dentes com polpa normal, evidenciando sua participação em estágio iniciais da infecção endodôntica, e não apenas nos casos de insucesso do tratamento.

Este estudo se mostrou inovador ao comparar os níveis de bactérias, de LPS e de LTA em dentes com pulpíte irreversível e polpa normal, evidenciando os aspectos infecciosos relacionados à infecção de curta duração. Perspectivas futuras relacionado a esta pesquisa se relacionam a possibilidade de análise comparativa de biomarcadores inflamatórios em dentes com pulpíte irreversível e polpa normal.

3 CONCLUSÃO

Dentes com diagnóstico de pulpíte irreversível sintomática apresentam maiores níveis microbianos e de fatores de virulência comparados a dentes com polpas normais, evidenciado intensa agressão microbiana ao complexo dentino-pulpar.

Fatores de virulência foram detectados em dentes com polpa normal, mesmo estes não apresentando crescimento bacteriano através do teste realizado.

REFERÊNCIAS^{1*}

Arruda-Vasconcelos R, Louzada LM, Feres M, Tomson PL, Cooper PR, Gomes BPFA. Investigation of microbial profile, levels of endotoxin and lipoteichoic acid in teeth with symptomatic irreversible pulpitis: a clinical study. *Int Endod J*. 2021 Jan;54(1):46-60.

Arruda-Vasconcelos R. Monitoramento clínico, microbiológico e imunológico de canais radiculares de pacientes submetidos à terapia endodôntica com diagnóstico de pulpite irreversível [tese]. Piracicaba: Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas; 2021.

Aveiro E, Chiarelli-Neto VM, de-Jesus-Soares A, Zaia AA, Ferraz CCR, Almeida JFA, et al. Efficacy of reciprocating and ultrasonic activation of 6% sodium hypochlorite in the reduction of microbial content and virulence factors in teeth with primary endodontic infection. *Int Endod J*. 2020 May;53(5):604-618.

Avila M, Ojcius DM, Yilmaz O. The oral microbiota: living with a permanent guest. *DNA Cell Biol*. 2009 Aug;28(8):405-11.

Barbosa-Ribeiro M, De-Jesus-Soares A, Zaia AA, Ferraz CC, Almeida JF, Gomes BP. Quantification of Lipoteichoic Acid Contents and Cultivable Bacteria at the Different Phases of the Endodontic Retreatment. *J Endod*. 2016a Apr;42(4):552-6.

Barbosa-Ribeiro M, De-Jesus-Soares A, Zaia AA, Ferraz CC, Almeida JF, Gomes BP. Antimicrobial Susceptibility and Characterization of Virulence Genes of *Enterococcus faecalis* Isolates from Teeth with Failure of the Endodontic Treatment. *J Endod*. 2016b Jul;42(7):1022-8.

Barbosa-Ribeiro M, Arruda-Vasconcelos R, de-Jesus-Soares A, Zaia AA, Ferraz CCR, de Almeida JFA, et al. Effectiveness of calcium hydroxide-based intracanal medication on infectious/inflammatory contents in teeth with post-treatment apical periodontitis. *Clin Oral Investig*. 2019 Jun;23(6):2759-66.

^{1*} De acordo com as normas da UNICAMP/FOP, baseadas na padronização do International Committee of Medical Journal Editors - Vancouver Group. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o PubMed.

Barbosa-Ribeiro M, Arruda-Vasconcelos R, Louzada LM, Dos Santos DG, Andreote FD, Gomes BPFA. Microbiological analysis of endodontically treated teeth with apical periodontitis before and after endodontic retreatment. *Clin Oral Investig*. 2021 Apr;25(4):2017-7.

Baumgartner JC, Falkler WA Jr. Bacteria in the apical 5 mm of infected root canals. *J Endod*. 1991 Aug;17(8):380-3.

Beutler B, Poltorak A. The search for Lps: 1993-1998. *J Endotoxin Res*. 2000;6(4):269-93.

Beutler B. Innate immunity: an overview. *Mol Immunol*. 2004 Feb;40(12):845-59.

Bhakdi S, Klonisch T, Nuber P, Fischer W. Stimulation of monokine production by lipoteichoic acids. *Infect Immun*. 1991 Dec;59(12):4614-20.

Cavalli D, Toia CC, Flores Orozco EI, Khoury RD, Cardoso FGDR, et al. Effectiveness in the Removal of Endotoxins and Microbiological Profile in Primary Endodontic Infections Using 3 Different Instrumentation Systems: A Randomized Clinical Study. *J Endod*. 2017 Aug;43(8):1237-45.

Chiarelli-Neto VM. Parâmetros microbiológicos e fatores de virulência dos canais radiculares de dentes com polpa vital normal [dissertação]. Piracicaba: Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas; 2019.

Ciardi JE, Rölla G, Bowen WH, Reilly JA. Adsorption of *Streptococcus mutans* lipoteichoic acid to hydroxyapatite. *Scand J Dent Res*. 1977 Sep;85(6):387-91.

Cohen J. *Statistical power analysis for the behavioral sciences*. 2nd ed. Hillsdale, NJ.: Lawrence Erlbaum Associates publishers; 1988.

Cohen S; Hargreaves KM. *Caminhos da Polpa*. 10ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier; 2011.

Dabdoub CB, Adorno JO, Urbano J, Silveira EN, Orlandi BM. Review of the Management of Infected Subdural Hematoma. *World Neurosurg*. 2016 Mar;87:663.e1-8.

Damle SG, Yadav R, Garg S, Dhindsa A, Beniwal V, Loomba A, Chatterjee S. Transmission of mutans streptococci in mother-child pairs. *Indian J Med Res.* 2016 Aug;144(2):264-70.

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, Prado M, Herrera DR, Gomes BPF. Periodontal and endodontic infectious/inflammatory profile in primary periodontal lesions with secondary endodontic involvement after a calcium hydroxide-based intracanal medication. *Clin Oral Investig.* 2019 Jan;23(1):53-63.

Endo MS, Martinho FC, Zaia AA, Ferraz CC, Almeida JF, Gomes BP. Quantification of cultivable bacteria and endotoxin in post-treatment apical periodontitis before and after chemo-mechanical preparation. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012 Oct;31(10):2575-83.

Estrela C e Pécora JD. Hidróxido de Cálcio na Endodontia. Ribeirão Preto: FORP-USP; 1997. Disponível em: <http://www.forp.usp.br/restauradora/calcio/introhc.htm>

Fouad AF. Endodontic infections and systemic disease. In: Fouad AF, editor. *Endodontic Microbiology.* Ames, IA: Wiley-Blackwell; 2009. p.320-38.

Gadê-Neto CR, Rodrigues RR, Louzada LM, Arruda-Vasconcelos R, Teixeira FB, Viana Casarin RC, et al. Microbiota of periodontal pockets and root canals in induced experimental periodontal disease in dogs. *J Investig Clin Dent.* 2019 Nov;10(4):e12439.

Ginsburg I. Role of lipoteichoic acid in infection and inflammation. *Lancet Infect Dis.* 2002 Mar;2(3):171-9.

Gomes BPF. An investigation into the root canal microflora [tese]. Manchester, UK: University of Manchester; 1995.

Gomes BPF. Investigação dos microrganismos envolvidos na sintomatologia e no insucesso do tratamento endodôntico [tese]. Piracicaba: Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, 2002.

Gomes BP, Pinheiro ET, Gadê-Neto CR, Sousa EL, Ferraz CC, Zaia AA, et al. Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiol Immunol*. 2004 Apr;19(2):71-6.

Gomes BP, Montagner F, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, de Almeida JF, et al. Antimicrobial action of intracanal medicaments on the external root surface. *J Dent*. 2009 Jan;37(1):76-81.

Gomes BP, Endo MS, Martinho FC. Comparison of endotoxin levels found in primary and secondary endodontic infections. *J Endod*. 2012 Aug;38(8):1082-6.

Gomes BP, Vianna ME, Zaia AA, Almeida JF, Souza-Filho FJ, Ferraz CC. Chlorhexidine in endodontics. *Braz Dent J*. 2013;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.

Gomes BPF, Francisco PA, Godoi EP Jr, Endo MS, Barbosa-Ribeiro M, Delboni MG, et al. Identification of Culturable and Nonculturable Microorganisms, Lipopolysaccharides, and Lipoteichoic Acids From Root Canals of Teeth With Endodontic Failure. *J Endod*. 2021 Jul;47(7):1075-1086.

Hahn CL, Best AM, Tew JG. Cytokine induction by *Streptococcus mutans* and pulpal pathogenesis. *Infect Immun*. 2000 Dec;68(12):6785-9.

Hirsch V, Wolgin M, Mitronin AV, Kielbassa AM. Inflammatory cytokines in normal and irreversibly inflamed pulps: A systematic review. *Arch Oral Biol*. 2017 Oct;82:38-46.

Hong CY, Lin SK, Kok SH, Cheng SJ, Lee MS, Wang TM, et al. The role of lipopolysaccharide in infectious bone resorption of periapical lesion. *J Oral Pathol Med*. 2004 Mar;33(3):162-9.

Jacinto RC, Gomes BP, 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 Aug;54(Pt 8):777-83.

Jiang J, Zuo J, Hurst IR, Holliday LS. The synergistic effect of peptidoglycan and lipopolysaccharide on osteoclast formation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003 Dec;96(6):738-43.

Takehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germfree and conventional laboratory rats. *J South Calif Dent Assoc.* 1966 Sep;34(9):449-51.

Khabbaz AY, Usta IM, El-Hajj MI, Abu-Musa A, Seoud M, Nassar AH. Rupture of an unscarred uterus with misoprostol induction: case report and review of the literature. *J Matern Fetal Med.* 2001 Apr;10(2):141-5.

Kuppermann N, Nelson DS, Saladino RA, Thompson CM, Sattler F, Novitsky TJ, et al. Comparison of a recombinant endotoxin-neutralizing protein with a human monoclonal antibody to endotoxin for the treatment of *Escherichia coli* sepsis in rats. *J Infect Dis.* 1994 Sep;170(3):630-5.

Levin LG, Law AS, Holland GR, Abbott PV, Roda RS. Identify and define all diagnostic terms for pulpal health and disease states. *J Endod.* 2009 Dec;35(12):1645-57.

Louzada LM, Arruda-Vasconcelos R, Duque TM, Casarin RCV, Feres M, Gomes BPFA. Clinical Investigation of Microbial Profile and Levels of Endotoxins and Lipoteichoic Acid at Different Phases of the Endodontic Treatment in Teeth with Vital Pulp and Associated Periodontal Disease. *J Endod.* 2020 Jun;46(6):736-47.

Lüderitz O, Galanos C, Rietschel ET. Endotoxins of Gram-negative bacteria. *Pharmacol Ther.* 1981;15(3):383-402.

Machado FP, Khoury RD, Toia CC, Flores Orozco EI, de Oliveira FE, de Oliveira LD, et al. Primary versus post-treatment apical periodontitis: microbial composition, lipopolysaccharides and lipoteichoic acid levels, signs and symptoms. *Clin Oral Investig.* 2020 Sep;24(9):3169-79.

Marsh PD. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv Dent Res.* 1994 Jul;8(2):263-71.

Marsh PD. Dental diseases--are these examples of ecological catastrophes? *Int J Dent Hyg.* 2006 Sep;4 Suppl 1:3-10; discussion 50-2.

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. Estudo microbiológico e de endotoxinas de canais radiculares com infecções endodônticas primárias e avaliação da antigenicidade do conteúdo infeccioso contra macrófagos na produção de citocinas pró-inflamatórias [tese]. Piracicaba: Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas; 2011.

Martinho FC, Gomes AP, Fernandes AM, Ferreira NS, Endo MS, Freitas LF, et al. Clinical comparison of the effectiveness of single-file reciprocating systems and rotary systems for removal of endotoxins and cultivable bacteria from primarily infected root canals. *J Endod.* 2014 May;40(5):625-9.

Martinho FC, de Rabello DGD, Ferreira LL, Nascimento GG. Participation of endotoxin in root canal infections: A systematic review and meta-analysis. *Eur J Dent.* 2017 Jul-Sep;11(3):398-406.

Mattison GD, Haddix JE, Kehoe JC, Progulsk-Fox A. The effect of *Eikenella corrodens* endotoxin on periapical bone. *J Endod.* 1987 Dec;13(12):559-65.

Miller WD. An introduction to the study of the bacteriopathology of the dental pulp. *Dent Cosmos.* 1894:505-28.

Möller AJ, Fabricius L, Dahlén G, Ohman AE, Heyden G. Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. *Scand J Dent Res.* 1981 Dec;89(6):475-84.

Nair R. Light and electron microscopic studies of root canal flora and periapical lesions. *J Endod.* 1987;1:29-39.

Narayanan LL, Vaishnavi C. Endodontic microbiology. *J Conserv Dent.* 2010 Oct;13(4):233-9.

Peters LB, van Winkelhoff AJ, Buijs JF, Wesselink PR. Effects of instrumentation, irrigation and dressing with calcium hydroxide on infection in pulpless teeth with periapical bone lesions. *Int Endod J.* 2002 Jan;35(1):13-21.

Raetz CR, Whitfield C. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem.* 2002;71:635-700.

Reife RA, Coats SR, Al-Qutub M, Dixon DM, Braham PA, Billharz RJ, et al. Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide lipid A heterogeneity: differential activities of tetra- and penta-acylated lipid A structures on E-selectin expression and TLR4 recognition. *Cell Microbiol.* 2006 May;8(5):857-68.

Ricucci D, Loghin S, Siqueira JF Jr. Correlation between clinical and histologic pulp diagnoses. *J Endod.* 2014 Dec;40(12):1932-9.

Rietschel ET, Brade H. Bacterial endotoxins. *Sci Am.* 1992 Aug;267(2):54-61.

Rôças IN, Siqueira JF Jr, Santos KR. Association of Enterococcus faecalis with different forms of periradicular diseases. *J Endod.* 2004 May;30(5):315-20.

Rôças IN, Hülsmann M, Siqueira JF Jr. Microorganisms in root canal-treated teeth from a German population. *J Endod.* 2008 Aug;34(8):926-31.

Rôças IN, Lima KC, Assunção IV, Gomes PN, Bracks IV, Siqueira JF Jr. Advanced Caries Microbiota in Teeth with Irreversible Pulpitis. *J Endod.* 2015 Sep;41(9):1450-5.

Rôças IN, Alves FR, Rachid CT, Lima KC, Assunção IV, Gomes PN, et al. Microbiome of Deep Dentinal Caries Lesions in Teeth with Symptomatic Irreversible Pulpitis. *PLoS One.* 2016 May 2;11(5):e0154653.

Sheiham A, James WP. Diet and Dental Caries: The Pivotal Role of Free Sugars Reemphasized. *J Dent Res.* 2015 Oct;94(10):1341-7.

Signoretto C, Lleò MM, Tafi MC, Canepari P. Cell wall chemical composition of Enterococcus faecalis in the viable but nonculturable state. *Appl Environ Microbiol.* 2000 May;66(5):1953-9.

Siqueira JF Jr, Rôças IN. Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 2--Redefining the endodontic microbiota. *J Endod.* 2005 Jul;31(7):488-98.

Siqueira JF Jr, Rôças IN. Diversity of endodontic microbiota revisited. *J Dent Res*. 2009 Nov;88(11):969-81.

Siqueira JF Jr, Roças IN, Lopes HP, Alves FRF, Oliveira JC, Armada L. Princípios biológicos do tratamento endodôntico de dentes com polpa necrosada e lesão perirradicular. *Rev. Bras. Odontol*. 2012 Jan; 69(1):8-14.

Sjögren U, Figdor D, Spångberg L, Sundqvist G. The antimicrobial effect of calcium hydroxide as a short-term intracanal dressing. *Int Endod J*. 1991 May;24(3):119-25.

Socransky SS, Hubersak C, Propas D. Induction of periodontal destruction in gnotobiotic rats by a human oral strain of *Actinomyces naeslundii*. *Arch Oral Biol*. 1970 Oct;15(10):993-5.

Vianna ME, Horz HP, Conrads G, Zaia AA, Souza-Filho FJ, Gomes BP. Effect of root canal procedures on endotoxins and endodontic pathogens. *Oral Microbiol Immunol*. 2007 Dec;22(6):411-8.

Wade WG. The oral microbiome in health and disease. *Pharmacol Res*. 2013 Mar;69(1):137-43.

Widmer C, Skutas J, Easson C, Lopez JV, Torneck C, Flax M, et al. Culture-independent Characterization of the Microbiome of Healthy Pulp. *J Endod*. 2018 Jul;44(7):1132-1139.e2.

Yoo YJ, Perinpanayagam H, Oh S, Kim AR, Han SH, Kum KY. Endodontic biofilms: contemporary and future treatment options. *Restor Dent Endod*. 2019 Jan 31;44(1):e7.

Zhao L, Chen J, Cheng L, Wang X, Du J, Wang F, et al. Effects of *Enterococcus faecalis* lipoteichoic acid on receptor activator of nuclear factor- κ B ligand and osteoprotegerin expression in periodontal ligament fibroblasts. *Int Endod J*. 2014 Feb;47(2):163-72.

ANEXOS

Anexo 1 – Verificação de originalidade e prevenção de plágio

ALINE NOGUEIRA TURNITIN

RELATÓRIO DE ORIGINALIDADE

8% ÍNDICE DE SEMELHANÇA	8% FONTES DA INTERNET	1% PUBLICAÇÕES	0% DOCUMENTOS DOS ALUNOS
-----------------------------------	---------------------------------	--------------------------	------------------------------------

FONTES PRIMÁRIAS

1	repositorio.unicamp.br Fonte da Internet	6%
2	Brenda P.F.A. Gomes, Lidiane M. Louzada, Rebecca F. Almeida-Gomes, Ericka T. Pinheiro et al. "Investigation of Filifactor alocis in primary and in secondary endodontic infections: A molecular study", Archives of Oral Biology, 2020 Publicação	1%
3	www.forp.usp.br Fonte da Internet	1%
4	tede.ufam.edu.br Fonte da Internet	1%

Excluir citações

Desligado

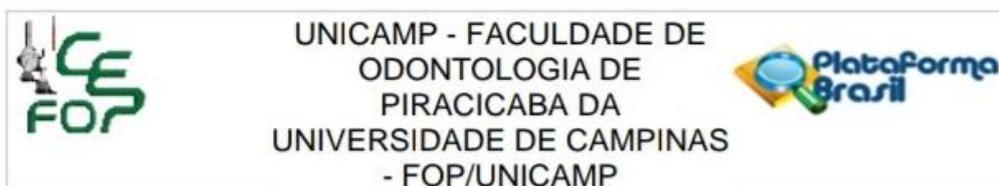
Excluir correspondências

< 1%

Excluir bibliografia

Desligado

Anexo 2 – Comitê de Ética em Pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Monitoramento clínico, microbiológico, imunológico e biomolecular das diferentes condições pulpares e perirradiculares

Pesquisador: Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes

Área Temática:

Versão: 7

CAAE: 86140218.0.0000.5418

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia de Piracicaba - Unicamp

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.015.959

Apresentação do Projeto:

O parecer inicial é elaborado com base na transcrição editada do conteúdo do registro do protocolo na Plataforma Brasil e dos arquivos anexados à Plataforma Brasil. Os pareceres de retorno, emendas e notificações são elaborados a partir do último parecer e dos dados e arquivos da última versão apresentada. Trata-se de SOLICITAÇÃO DE EMENDA (E2) AO PROTOCOLO originalmente aprovado em 10/08/2018, emendado (E1) em 09/12/2019, para inclusão de novos pesquisadores. O parecer foi atualizado de acordo com a documentação apresentada. A descrição detalhada da solicitação está ao final do parecer.

A LISTA DE PESQUISADORES citada na capa do protocolo inclui BRENDA PAULA FIGUEIREDO DE ALMEIDA GOMES (Cirurgiã-Dentista, Docente Titular da área de Endodontia da FOP-UNICAMP, pesquisadora responsável, orientadora), EMELLY DE AVEIRO (Cirurgiã-Dentista, Mestranda no PPG em Clínica Odontológica da FOP-UNICAMP), JULIANA DELATORRE BRONZATO (Cirurgiã-Dentista, Pesquisadora Colaboradora na FOP-UNICAMP), EZEQUIEL GABRIELLI (Cirurgião-Dentista, Mestrando no PPG em Clínica Odontológica da FOP-UNICAMP), LIDIANE MENDES LOUZADA (Cirurgiã-Dentista, Mestranda no PPG em Clínica Odontológica da FOP-UNICAMP), MARIA EUNICE DA SILVA DAVIDIAN (Cirurgiã-Dentista, Doutoranda no PPG em Clínica Odontológica da FOP-UNICAMP), VITO MADIO CHIARELLI NETO (Cirurgião-Dentista, Mestrando no PPG em Clínica Odontológica da FOP-UNICAMP), RODRIGO ARRUDA VASCONCELOS (Cirurgião-Dentista, Mestrando no PPG em Clínica Odontológica da FOP-UNICAMP, pesquisador participante), BEATRIZ ISABEL NOGUEIRA LEMOS (Graduanda no curso de Odontologia da FOP-UNICAMP, Incluída em E2), NATHALIA REICHE MOREIRA (Graduanda no curso de Odontologia da FOP-UNICAMP, Incluída em E2), ALINE VITORIA DE SOUZA NOGUEIRA (Graduanda no curso de Odontologia da FOP-UNICAMP, Incluída em E2), o que é confirmado na declaração dos pesquisadores e na PB.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av. Limeira 901 Caixa Postal 52
Bairro: Areião **CEP:** 13.414-903
UF: SP **Município:** PIRACICABA
Telefone: (19)2106-5349 **Fax:** (19)2106-5349 **E-mail:** cep@fop.unicamp.br