



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

ARIANE CASSIA SALUSTIANO MARINHO DE ALENCAR

**INVESTIGAÇÃO DA PATOBIOLOGIA DO LPS NAS INFECÇÕES
ENDODÔNTICAS E SUA SUSCETIBILIDADE A DIFERENTES MODALIDADES
TERAPÊUTICAS**

**INVESTIGATION OF LPS PATHOBIOLOGY IN ENDODOTIC INFECTIONS AND
ITS SUSCEPTIBILITY TO DIFFERENT THERAPEUTIC MODALITIES**

**PIRACICABA
2016**

ARIANE CASSIA SALUSTIANO MARINHO DE ALENCAR

**INVESTIGAÇÃO DA PATOBIOLOGIA DO LPS NAS INFECÇÕES
ENDODÔNTICAS E SUA SUSCETIBILIDADE A DIFERENTES MODALIDADES
TERAPÊUTICAS**

**INVESTIGATION OF LPS PATHOBIOLOGY IN ENDODOTIC INFECTIONS AND
ITS SUSCEPTIBILITY TO DIFFERENT THERAPEUTIC MODALITIES**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutora em Clínica Odontológica, Área de Endodontia.

Thesis presented to the Piracicaba Dental School of the State University of Campinas in partial fulfillment of requirements for the degree of Doctor in Dental Clinics, Endodontics area.

Orientadora: Prof^a Dr^a Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes

Este exemplar corresponde à versão final da tese defendida pela aluna Ariane Cassia Salustiano Marinho de Alencar e orientada pela Profa. Dra. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes

PIRACICABA

2016

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): FAPESP, 2013/02402-9

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Heloisa Maria Ceccotti - CRB 8/6403

M338i Marinho, Ariane Cassia Salustiano, 1985-
Investigação da patobiologia do LPS nas infecções endodônticas e sua susceptibilidade a diferentes modalidades terapêuticas / Ariane Cassia Salustiano Marinho. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2016.

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

1. Bactérias. 2. Citocinas. 3. Clorexidina. 4. Endotoxinas. 5. Hipoclorito de sódio. I. Gomes, Brenda Paula Figueiredo de Almeida. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Investigation of LPS pathobiology in endodontic infections and its susceptibility to different therapeutic modalities

Palavras-chave em inglês:

Bacteria

Cytokines

Chlorhexidine

Endotoxins

Sodium Hypochlorite

Área de concentração: Endodontia

Titulação: Doutora em Clínica Odontológica

Banca examinadora:

Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes [Orientador]

Daniel Pinto de Oliveira

Fábio Renato Manzolli Leite

Frederico Canato Martinho

Rogério de Castilho Jacinto

Data de defesa: 18-11-2016

Programa de Pós-Graduação: Clínica Odontológica



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 18 de Novembro de 2016, considerou a candidata ARIANE CASSIA SALUSTIANO MARINHO ALENCAR aprovada.

PROFª. DRª. BRENDA PAULA FIGUEIREDO DE ALMEIDA GOMES

PROF. DR. DANIEL PINTO DE OLIVEIRA

PROF. DR. FÁBIO RENATO MANZOLLI LEITE

PROF. DR. FREDERICO CANATO MARTINHO

PROF. DR. ROGÉRIO DE CASTILHO JACINTO

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

DEDICATÓRIA

A ti, Senhor, dedico este trabalho por tua fidelidade na minha vida, com a certeza de que tudo é possível àquele que crê. Obrigada por abrir os caminhos e me conduzir ao melhor que tens pra mim, me sustentando seja no monte ou no vale.

AOS MEUS PILARES

À minha amada mãe **Eliete Salustiano**, pelo seu amor incondicional e generosidade em me deixar “bater as asas” para alçar vôos maiores em busca de um sonho, mesmo que isso implicasse em saudade. Saudade que dói. Mas, mesmo na distância, a senhora me deu total apoio em todos os momentos e me deu a força necessária para prosseguir. Sem você, eu nada seria. Te amo mamãe.

Ao meu irmão **Arthur Tardelli**, meu fiel escudeiro. O melhor irmão do mundo. Prometo que iremos compensar todos esses anos distantes. Suas orações me fortaleceram e me mantiveram de pé. Obrigada por cuidar da nossa mãe de forma ímpar. Sou a irmã mais feliz do mundo por ter você em minha vida!

Obrigada por vibrar minhas conquistas, chorar comigo nos momentos de cansaço, por me estenderem a mão, por dividir uma palavra de esperança e um sorriso nos momentos de alegria.

Se hoje eu cheguei até aqui foi porque, antes de qualquer outra pessoa, vocês acreditaram em mim! O mérito é todo de vocês!
Amo vocês!

*Ao meu amado esposo **Thiago de Alencar Ramos**, minha maior conquista! Meu troféu! Quem um dia alguém imaginaria que ao vir à Piracicaba, Deus me permitiria a melhor formação acadêmica e que também me daria um marido dos sonhos? Você é a materialização do plano perfeito de Deus pra mim. Sou abençoada por compartilhar cada dia, cada momento, cada minuto da minha vida ao seu lado. Obrigada pelo companheirismo e me impulsionar a vencer. Essa conquista é sua também.*

AGRADECIMENTO ESPECIAL

*À minha querida orientadora, Profa. Dra. **Brenda P. F. A. Gomes**, por me orientar, acompanhar, aconselhar, encorajar. Poderia listar inúmeros verbos aqui para expressar o que a senhora fez por mim, mas, certamente não caberiam nessa página.*

Tudo que vivi durante minha formação acadêmica eu devo à senhora. Experiências enriquecedoras! Durante o estágio no laboratório, Especialização, Mestrado, Doutorado e Doutorado sanduíche. Sua alegria, companheirismo, simpatia e bom ânimo no dia-a-dia, nas viagens, nos congressos, ficarão para sempre na memória.

Meu coração se enche de gratidão por ter tido a oportunidade de ter uma mentora, líder que instiga em nós o senso investigativo, nos inspira à docência, que torce a cada conquista e nos encoraja e motiva a cada falha. A senhora tem o dom de fazer aflorar aquilo de temos de bom e acredita no nosso potencial.

Sobretudo, a senhora representa muito mais do que minha orientadora, muitas vezes foi mãe, amiga, conselheira. Sua mão estendida fez a diferença. Eu sou prova viva disso!

Quero deixar registrado aqui: Obrigada por tudo professora!

ACKNOWLEDGEMENT

*I would like to thank **Dr. Richard Darveau** for having me as visiting Reasearcher during my Post-graduate course in his Laboratory, Department of Periodontics/ Oral biology, University of Washington (Seattle, WA, USA). I could describe this as a challenging but a rewarding experience. Surely his expertise in LPS studies and inflammatory reasearch field has an enormous relevance in my academic journey.*

Thank you!

AGRADECIMENTOS

Às famílias **Salustiano/Alencar Ramos** pelos ensinamentos de vida e por celebrar todas as minhas conquistas.

Aos professores **Dr. Daniel Pinto de Oliveira, Dr. Frederico Canato Martinho, Dr. Rogério de Castilho Jacinto, Dr. Fábio Renato Manzolli Leite** que aceitaram o convite para compor a comissão avaliadora da minha defesa de Doutorado elevando a qualidade desta obra. Bens materiais, certamente, não pagariam o que vocês fizeram por mim. Muito obrigada!

Aos professores **Dr. José Flávio Affonso de Almeida, Dr. Rafael Nobrega Stipp, Dr. Daniel Rodrigo Herrera Morante** que aceitaram prontamente o convite para enriquecer os manuscritos da minha Tese de Doutorado durante minha qualificação.

Ao meu professor e amigo **Dr. Daniel Pinto de Oliveira**. Você foi minha inspiração para vir à Piracicaba em busca da concretização do sonho de me tornar professora. A você, minha estima e admiração.

Ao professor da Periodontia **Prof. Dr. Fábio Renato Manzolli Leite** da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) e ao amigo **Gustavo G. Nascimento**, pelo apoio incondicional à realização desta pesquisa. Sempre solícitos e dispostos a ajudar desde o início da pesquisa. As etapas de estimulação celular, análise estatística e correção dos artigos foram enriquecidas certamente com a contribuição de vocês. Meu muitíssimo obrigada.

Às amigas **Ana Regina Polay** pela acessoria técnica e pela amizade que surgiu

*dentre tantos testes de quantificação de endotoxina e **Izilvânia Barreto** pela brilhante ajuda na execução da etapa de quantificação microbiana.*

*Ao amigo **Rodrigo Arruda Vasconcelos** pela enorme colaboração com a execução dos testes moleculares. Obrigado pela amizade e ajuda que você sempre me deu.*

*Aos grandes amigos endodontistas que a Faculdade de Odontologia de Piracicaba me deu a oportunidade de tê-los, **Fernanda Graziela Corrêa Signoretti, Francisco Montagner, Frederico Canato Martinho, Giselle Priscilla Cruz Abi Rached, Marcos Sérgio Endo, Maria Rachel Figueiredo Penalva Monteiro e Rogério de Castilho Jacinto** por dividirem comigo as alegrias, risadas e angústias. Obrigada pela amizade, carinho, conselhos. Vocês são maravilhosos. Amigos pra uma vida inteira.*

*Às amigas **Camila Lima de Andrade** e **Lívia Foster Ribeiro** por serem meu braço forte. Mais do que amigas, minhas irmãs. Vocês são o significado de “amizade pra sempre”.*

*A **todos os pacientes** que participaram desta pesquisa! Sem a presença deles este trabalho não seria realizado! Meus sinceros agradecimentos!*

À Direção da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, na pessoa do seu diretor **Prof. Dr. Guilherme Elias Pessanha Henriques**.

À **Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pela concessão da bolsa de Doutorado, processo nº 2013/02402-9.

À **Profa. Dra. Renata Cunha Matheus Rodrigues Garcia**, coordenadora do Programa de Pós-Graduação da FOP/UNICAMP e a **Profa Dra. Karina Gonzales Silvério Ruiz**, coordenadora do curso de Pós-Graduação em Clínica Odontológica.

Aos professores da área de Endodontia, **profa. Dra. Adriana de Jesus Soares**, **prof. Dr. Alexandre Augusto Zaia**, **profa. Dra. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes**, **prof. Dr. Caio Cezar Randi Ferraz** e **prof. Dr. José Flávio Affonso de Almeida**.

Aos funcionários **Ana Godoy**, **Eliane Melo Franco de Souza**, **Eliene Narvaes e Maicon Ricardo Zieberg Passini**.

À **Ana Paula Carone**, **Claudinéia Prata Pradela**, **Érica A. Pinho Sinhoreti**, **Lucas de Almeida Cruz** e **Raquel Q. Marcondes Cesar**, profissionais da secretaria da Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas.

A todos os **funcionários** da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas.

*Aos professores da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, **Altair Antoninha Del Bel Cury, Célia Marisa Rizzatti Barbosa, Cinthia Machado Tabchoury, Débora Alves Nunes Leite Lima, Eduardo Dias de Andrade, Flávio Henrique Baggio Aguiar, Francisco Carlos Groppo, Glaucia Maria Ambrosano, José Ricardo de Albergaria Barbosa, José Roberto Lovadino, Livia Tenuta, Luciana Asprino, Luís Alexandre Paulillo, Luís Roberto Marcondes, Márcio Casati, Márcio de Moraes, Maria Cristina Volpato, Pedro Luiz Rosalen, Renata Cunha Matheus, Wander José da Silva,** pela admiração e convívio agradável durante minha vida acadêmica em Piracicaba.*

*Aos colegas de mestrado **Augusto Rodrigues Lima, Bruna Alves T. Ueno, Bruna Milaré Angelieri, Diogo Henrique da Silva, Eloá Cristina Bicego Pereira, Flávia M. Saavedra e Paula, Jaqueline Mafrá Lazzari e Rafaela Casadei Chapola.***

*Aos colegas de doutorado **Aline Cristine Gomes, Ana Carolina C. L. de Cerqueira Neto, Aniele Carvalho Lacerda, Andréa Cardoso Pereira, Cimara Barroso Braga Brum, Érika Manuela Asteria Clavijo, Felipe Nogueira Anacleto, Mário Luis Zuolo, Maria Cristina Coelho de Carvalho, Marcelle Louise S. Bourreau e Tiago Pereira da Rosa.***

*A todos os colegas da Faculdade de Odontologia de Piracicaba que participaram da minha vida acadêmica: **Camila Lima Mota Moreira, Ezilmara Leonor Rolim de Sousa, Ezymar Cayana, Flaviana Bombarda de Andrade, Francisco Montagner, Frederico Canato Martinho, Helena Rosa Campos Rabang, Juliana Melo, Juliana Nunes Botelho, Karine Schell Nicastro, Livia Forster, Maraísa Greggio Delboni, Marcos Frozoni, Maria Eunice Davidian, Patrick Baltieri, Paulo Hemerson de Moraes, Ricardo Ferreira, Rogério de Castilho Jacinto, Thaís Accorsi Mendonça, Thaís Bellato, Vanessa Berber, e***

Wanderson Miguel Maia Chiesa, pelo aprendizado e convívio agradável compartilhado nesses anos.

*“O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada;
caminhando e semeando, no fim terás o que colher.”*

Cora Coralina

RESUMO

Os microrganismos e seus fatores de virulência incluindo os lipopolissacarídeos (LPS) são os principais agentes etiológicos da doença endodôntica. Estratégias clínicas devem voltar-se para a máxima desagregação/redução da carga microbiana, assim como para eliminação e/ou inativação dos LPS e demais produtos tóxicos, de maneira a reduzir o potencial inflamatório do conteúdo endodôntico a níveis compatíveis com o reparo dos tecidos perirradiculares. Os objetivos do presente estudo foram: **1)** Investigar a influência da interação entre substâncias antimicrobianas utilizadas na terapia endodôntica e o substrato *Limulus Amebocyte Lysate* (LAL) para quantificação de endotoxinas, com o objetivo de identificar substâncias interferentes na leitura dos níveis de endotoxinas em amostras clínicas (**Artigo 1**); **2)** estudar o perfil da microbiota e níveis de endotoxinas nas infecções endodônticas primárias com lesão periapical, determinando o potencial inflamatório do conteúdo endodôntico contra macrófagos através da produção de IL1- β e TNF- α . Além disso, comparar “*in vivo*” a efetividade do preparo químico-mecânico (PQM) com NaOCl 2,5% e Clorexidina (CHX) gel 2% e após o uso do EDTA 17% e medicação intracanal na eliminação de LPS, tendo como controle, soro fisiológico (**Artigo 2**); **3)** Avaliar a efetividade do sistema de instrumentação recíprocante de lima única, Reciproc R25, em comparação com sistemas rotatórios convencionais de limas múltiplas, na remoção de bactérias e endotoxinas de canais radiculares contaminados (**Artigo 3**); **4)** Monitorar “*in vivo*” a efetividade do preparo químico-mecânico (PQM) com NaOCl 2,5% e Clorexidina (CHX) gel 2% (tendo como controle o soro fisiológico [SS]), após o uso do EDTA 17% e uso do hidróxido de cálcio por 30 dias, como medicação intracanal, elucidando a contribuição de cada etapa da terapia endodôntica na redução de endotoxinas (**Artigo 4**); **5)** Investigar a influência das substâncias químicas auxiliares da terapia endodôntica e da medicação à base de hidróxido de cálcio na estrutura e bioatividade do lipopolissacarídeo bacteriano, visando elucidar a ocorrência de possíveis implicações na detecção do lipídeo A/ LPS e posteriormente, seu potencial

imunoestimulador em receptores TLR-4 (**artigo 5**). **Métodos:** Amostras foram coletadas de canais radiculares utilizando cones de papel estéreis/despirogenizados. PCR (16S rDNA), contagem de unidades formadoras de colônias e método LAL foram utilizados. Macrófagos Raw 264.7 foram estimulados com conteúdo endodôntico infeccioso e determinação dos níveis de IL1- β e TNF- α foi realizada por meio de ELISA. Espectrometria de massa (MALDI-TOF) e *silver staining* determinaram a presença de picos de lipídeo A e bandas correspondentes à presença de LPS após tratamentos, respectivamente. Em paralelo, ativação de TLR-4 foi realizada para determinação do potencial imunoestimulador do LPS. **Resultados:** **1)** Água oxigenada 30%, Otosporin[®] e pasta tripla antibiótica causaram inibição/superestimulação dos níveis de endotoxina em todas as diluições testadas (**artigo 1**); **2)** *Porphyromonas gingivalis* (17/30), *Porphyromonas endodontalis* (15/30) e *Prevotella nigrescens* (11/30) foram as espécies bacterianas mais prevalentes em infecções endodônticas primárias. Endotoxinas foram detectadas em 100% dos canais radiculares. O PQM foi capaz de reduzir significativamente os níveis de LPS ($p < 0.05$). NaOCl 2,5% associado à instrumentação rotatória Mtwo[®] obteve menores níveis de LPS residuais (NaOCl 2,5%= 0,09 EU/mL; CHX 2%= 0,81 EU/mL; SS= 4,81 EU/mL). Após uso do EDTA 17% e do hidróxido de cálcio não foram encontradas diferenças estatísticas entre NaOCl 2,5% e CHX gel 2%. IL-1 β and TNF- α foram produzidos por macrófagos estimulados com conteúdo endodôntico inicial, decrescendo seus níveis proporcionalmente após a incorporação do procedimento intracanal subsequente ($p < 0.05$) (**artigo 2**); **3)** Não houve diferença entre o sistema Reciproc R25 e os sistemas rotatórios convencionais de limas múltiplas na remoção de bactérias e endotoxinas de canais radiculares contaminados, respectivamente: Reciproc (99.34% e 91.69%); GII - Mtwo (99.86% e 83.11%); GIII- ProTaper (99.93% e 78.56%); and GIV- FKG Race[™] (99.99% e 82.52%) (**artigo 3**); **4)** PQM foi capaz de reduzir significativamente os níveis de LPS: NaOCl 2.5% (99.65%) (GI), CHX 2% (94.27%) (GII), e SS (96.79%) (GIII) ($p < .05$). Medicação intracanal por 30 dias contribuiu para potencializar a redução de endotoxinas: NaOCl 2.5% (90%) (GI),

CHX 2% (88.8%) (GII) e SS (85.7%) (GIII, $p < .05$) (**artigo 4**); **5**) NaOCl 5,25% e Ca(OH)_2 após 24h induziram a perda de detecção de lipídeo A e de LPS, enquanto que nenhuma alteração estrutural foi observada após espectrometria de massa do lipídeo A e *silver staining* do LPS tratado com as demais substâncias químicas auxiliares. Quanto à ativação de TLR-4, LPSs tratados por NaOCl 5,25% e Ca(OH)_2 foram significativamente menos potentes em ativar TLR-4 quando comparado com as demais substâncias testadas (**artigo 5**). **Conclusão: 1)** Características de desempenho - precisão e reprodutibilidade- do teste cinético turbidimétrico para quantificação de endotoxinas são influenciadas pela interação do substrato LAL com água oxigenada 30%, Otosporin[®] e pasta tripla antibiótica (**artigo 1**); **2)** Endotoxinas estão presentes em todos os canais radiculares, estimulando a produção de citocinas pró-inflamatórias. Procedimentos adicionais após o PQM potencializam a redução de endotoxinas. Conseqüentemente, há progressiva redução do potencial inflamatório do conteúdo endodôntico quanto à produção de IL1- β e TNF- α (**artigo 2**); **3)** O sistema rotatório recíprocante de lima única foi tão efetivo quanto os sistemas rotatórios convencionais de múltiplas limas na remoção de bactérias e endotoxinas de canais radiculares contaminados (**artigo 3**); **4)** Elevada redução de endotoxinas ocorre após o preparo químico-mecânico e após uso da medicação intracanal (**artigo 4**); **5)** NaOCl 5,25% e pasta de hidróxido de cálcio são capazes de induzir perda de detecção do lipídeo A/LPS, comprometendo sua integridade estrutural e, portanto, neutralizando seu potencial imunoestimulador em receptores TLR-4 (**artigo 5**).

Palavras-Chave: Bactérias. Endotoxinas. Citocinas. Hipoclorito de sódio. Clorexidina. Hidróxido de cálcio. Toll-like receptor 4. Endodontia.

ABSTRACT

Microorganisms and their virulence factors including lipopolysaccharides (LPS) are the main etiological agents of endodontic disease. Clinical strategies should focus on the maximum microbial disintegration / reduction, as well as on elimination or inactivation of LPS and other toxic products, in order to reduce the inflammatory potential of the endodontic contents to levels compatible with periradicular tissue healing. The objectives of this study were: **1)** To investigate the influence of the interaction of antimicrobial substances used in endodontic therapy and *Limulus ameobocyte lysate* (LAL) substrate in order to identify interfering substances for endotoxin measurement in clinical samples (**article 1**); **2)** To determine target bacterial species and endotoxin levels in primary endodontic infections and the inflammatory potential of endodontic content against macrophages through IL1- β e TNF- α production. Elimination of LPS was assessed by the chemo-mechanical preparation (CMP) with 2.5% NaOCl or 2% Chlorhexidine (CHX) gel and after the use of 17% EDTA and intracanal dressing, using saline solution (SS) as a control (**article 2**); **3)** To assess the effectiveness of a reciprocating single-file instrumentation system (Reciproc R25) compared to conventional rotary multiple-file systems in removing bacteria and endotoxin from contaminated root canals (**article 3**); **4)** To monitor the effectiveness of the chemo-mechanical preparation (CMP) by testing 2.5% NaOCl and 2% Chlorhexidine (CHX) gel 2% (using saline [SS] as a control) after the use of 17% EDTA and calcium hydroxide paste, elucidating the contribution of each step of the endodontic therapy in the reduction of endotoxins (**article 4**); **5)** To investigate the influence of auxiliary chemical substances of endodontic therapy and calcium hydroxide dressings on the structure and bioactivity of bacterial lipopolysaccharide, and thus to elucidate the occurrence of Lipid A/LPS structural alterations and their further functional response in TLR-4 (**article 5**). **Methods:** Samples were collected from root canals using sterile/ apirogenic paper points. PCR (16S rDNA), counting of colony forming

units and LAL method were performed. IL-1 β e TNF- α produced by macrophages were measured by ELISA. Structural analysis of the lipid A/LPS was conducted by means of MALDI-TOF mass spectrometry and silver staining, respectively. TLR-4 activation was performed to determine the immunostimulatory potential of LPS after different treatments. **Results: 1)** Hydrogen peroxide 30%, Otosporin® and triple antibiotic paste caused inhibition/ enhancement of endotoxin levels in all dilutions (**article 1**); **2)** *Porphyromonas gingivalis* (17/30), *Porphyromonas endodontalis* (15/30) and *Prevotella nigrescens* (11/30) were the most prevalent bacterial species in primary endodontic infections. Endotoxins were present in 100% of root canals. CMP drastically reduced endotoxins ($p < .05$). 2.5% NaOCl associated to rotary instrumentation obtained the highest reduction (NaOCl 2,5%= 0,09 EU/mL; CHX 2%= 0,81 EU/mL; SS= 4,81 EU/mL). After rinse with 17% EDTA and intracanal dressing no statistical differences were found between groups ($p > .05$). IL-1 β and TNF- α were produced by macrophages stimulated with initial endodontic content. A proportional decrease of cytokine levels was found after each root canal procedure ($p < 0.05$) (**article 2**); **3)** No statistical differences were found between the Reciproc R25 and conventional rotary instrumentation systems for bacterial and endotoxin removal, respectively: Reciproc (99.34% and 91.69%); GII - Mtwo (99.86% and 83.11%); GIII- ProTaper (99.93% and 78.56%); and GIV-FKG Race™ (99.99% and 82.52%) ($p > 0.01$) (**article 3**); **4)** Irrespective of the irrigant, CMP was able to significantly reduce LPS levels: NaOCl 2.5% (99.65%) (GI), CHX 2% (94.27%) (GII), and SS (96.79%) (GIII) ($p < .05$). Calcium hydroxide paste for 30 days contributed to enhance endotoxin reduction: NaOCl 2.5% (90%) (GI), CHX 2% (88.8%) (GII) and SS (85.7%) (GIII, $p < .05$) (**article 4**); **5)** 5.25% NaOCl and Ca(OH)₂ induced both loss of peak of lipid A and LPS detection, while no structural alteration was observed after LPS treatment with other auxiliary chemical substances. In parallel, LPSs treated with 5.25% NaOCl and Ca(OH)₂ were significantly less potent in activating TLR4 when compared to other substances ($p < 0.0001$) (**article 5**). **Conclusions: 1)** The performance characteristics - accuracy and reproducibility- of the turbidimetric kinetic assay for

quantification of endotoxins are influenced by the interaction of LAL substrate with Hydrogen peroxide 30%, Otosporin® and triple antibiotic paste (**article 1**); 2) Endotoxins were present in every canal, stimulating the pro-inflammatory cytokines production. Additional endodontic procedures after CMP enhance endotoxin reduction. Consequently, it was found a progressively lower activation of macrophages for IL-1 β and TNF- α production (**article 2**); 3) A single-file reciprocating instrumentation system (R25) was as effective as the rotary multiple-file systems for bacteria and endotoxin removal from contaminated root canals (**article 3**); 4) High endotoxin reduction occurs after chemical-mechanical preparation and after the use of calcium hydroxide paste (**article 4**); 5) 5.25% NaOCl and calcium hydroxide paste were capable of inducing loss of lipid A peaks and LPS detection, rendering a lower immunostimulatory potential against TLR-4 (**article 5**).

Key Words: Bacteria. Endotoxin. Cytokines. Sodium Hypochlorite. Chlorhexidine. Calcium hydroxide. Toll-like receptor 4. Endodontics

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	24
2	ARTIGOS	36
2.1	Artigo 1- Accuracy of Turbidimetric Limulus Amebocyte Lysate Assay for the recovery of endotoxin interacted with commonly used antimicrobial agents of endodontic therapy	36
2.2	Artigo 2- Proinflammatory activity of primarily infected endodontic content against macrophages after different phases of the root canal therapy	60
2.3	Artigo 3- Does the Reciproc file remove root canal bacteria and endotoxins as effectively as multifile rotary systems?	89
2.4	Artigo 4- Monitoring the effectiveness of root canal procedures on endotoxin levels found in teeth with chronic apical periodontitis	110
2.5	Artigo 5- Detection and function of lipopolysaccharide and its purified lipid A after treatment with auxiliary chemical substances and calcium hydroxide dressings used in endodontic therapy	125
3	DISCUSSÃO	154
3.1	Justificativa da pesquisa.....	154
3.2	Validação do método de quantificação de endotoxinas em contato com substâncias químicas utilizadas na terapia endodôntica	157
3.3.	Detecção de microrganismos nas infecções endodônticas primárias pelo método de PCR 16S rDNA.....	159
3.4	Lipopolissacarídeo e seu potencial inflamatório	161
3.5	Ação física da substância química auxiliar nos níveis de endotoxinas na presença de fluxo-refluxo	163
3.6	Ação química da medicação intracanal à base de hidróxido de cálcio na quantificação dos níveis de endotoxinas	166
3.7	Avaliação do potencial inflamatório do conteúdo endodôntico -Estimulação celular e dosagem de citocinas inflamatórias	167

3.8 Ação mecânica do preparo do canal radicular nos níveis de bactérias e endotoxinas	173
3.9 Alteração estrutural do LPS em contato com substâncias químicas auxiliares e hidróxido de cálcio (contato direto).....	174
3.10 Avaliação do potencial inflamatório do LPS após diferentes tratamentos – Ativação de TLR-4.....	176
3.11 Considerações finais	180
4 CONCLUSÃO.....	182
APÊNDICE I – Material e métodos e ilustrações dos experimentos realizados na pesquisa.....	200
ANEXO I – Certificado de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Humana (Artigos 1 e 2).....	237
ANEXO II – Certificado de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Humana (Artigos 3 e 4).....	238
ANEXO III- Biografia.....	239
ANEXO IV- Lista de publicações geradas pela tese	240
ANEXO V – Texto para divulgação	241

1 INTRODUÇÃO

Bactérias e produtos tóxicos do seu metabolismo atuam como agentes etiológicos para o desenvolvimento e perpetuação das lesões pulpares e perirradiculares (Takehashi *et al.*, 1965; Gomes *et al.*, 1994; Endo *et al.*, 2013; Rahimi *et al.*, 2014).

Microrganismos podem chegar à polpa por diferentes vias de acesso, sendo a mais comum através da lesão de cárie (Gomes *et al.*, 1994). Uma vez reconhecida a presença de microrganismos e seus subprodutos nos túbulos dentinários, um processo imuno-inflamatório clássico é arquitetado no tecido pulpar que, por suas características anatômicas peculiares, sofre alterações irreversíveis, caracterizadas por inflamação severa, progredindo de forma compartimentalizada para a necrose tecidual (Gomes *et al.*, 1994). Bactérias e seus subprodutos penetram nos túbulos dentinários, propagam-se por todo o sistema de canais radiculares, incluindo ramificações, istmos e deltas apicais, alcançando a região periapical e causando as periodontites apicais (Nair, 1987; Baumgartner & Falkler, 1991; Sjögren *et al.*, 1991).

A composição microbiana dos casos de necrose pulpar é reflexo das condições que o ambiente oferece para suprir as exigências nutricionais e físico-químicas dos microrganismos colonizadores. Estudos mostram que esta infecção é polimicrobiana, constituída predominantemente por microrganismos anaeróbios estritos Gram-negativos (Jacinto *et al.*, 2003, Gomes *et al.*, 2004, Gomes *et al.*,

2005; Gomes *et al.*, 2006; Gomes *et al.*, 2008; Montagner, 2010; Martinho *et al.*, 2011).

Uma vez que a microbiota endodôntica representa uma parcela restrita da microbiota presente na cavidade oral (Gomes *et al.*, 2015), é razoável considerar que parte significativa desta microbiota encontra-se potencialmente subestimada pelos métodos de detecção tradicionais. Sob este paradigma, abordagens moleculares independentes de cultivo oferecem uma alternativa rápida e sensível, permitindo também a quantificação de bactérias fastidiosas e não cultiváveis, levando a uma caracterização microbiana mais acurada (Munson *et al.*, 2002; Rolph *et al.*, 2001). Pesquisas mostram que as interações entre comunidades bacterianas parecem ser o elemento principal no crescimento e sobrevivência de microrganismos em seu habitat, e influenciam na sua habilidade em produzir doenças (Siqueira & Rôcas, 2003, Gomes *et al.*, 2015, in press).

Com o avanço no surgimento de técnicas para identificação de microrganismos anaeróbios estritos, diversos estudos procederam para determinar a prevalência de determinadas espécies bacterianas e interações dessas nas diferentes patologias pulpares e perirradiculares, uma vez que, essas interações representam papel chave no desenvolvimento ou progressão de sinais e sintomas das patologias endodônticas. Achados indicam que bacilos Gram-negativos anaeróbios estritos, particularmente espécies pertencentes aos gêneros *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Treponema* e *Fusobacterium* estão envolvidas nas infecções endodônticas primárias em dentes com sintomatologia dolorosa, tais

como dor à percussão e à palpação, e exercem um papel significativo na patogênese das lesões inflamatórias periapicais (Griffie *et al.*, 1980; Yoshida *et al.*, 1987; Gomes *et al.*, 1994, 1996; Baumgartner *et al.*, 1999; Siqueira *et al.*, 2001, Jacinto *et al.*, 2003, Sakamoto *et al.*, 2006). O emprego desses métodos pode ser útil para o diagnóstico, prognóstico, determinação da terapia a ser utilizada, e até mesmo na avaliação da suscetibilidade à doenças (Gomes & Montagner, 2010).

O método da *Polimerase Chain Reaction* (PCR) e suas diversas variações (Nested-PCR, Multiplex PCR, Real-Time Quantitative PCR) é universalmente utilizado para o estudo de DNA e RNA de um microrganismo em uma amostra clínica, mesmo quando este não é cultivável, está presente em pequeno número ou esteja morto na amostra coletada (Siqueira & Rôças, 2005). Todas elas são baseadas na identificação bacteriana através do gene 16S rRNA, uma região do cromossomo bacteriano presente em todo o domínio Bacteria (Chan & McLaughlin, 2000).

A intensidade da resposta imunológica é dependente da quantidade, da qualidade, do tempo e da virulência da microbiota presente (Homji *et al.*, 2012; Martinho *et al.*, 2010, 2011, 2012). Portanto, tão importante quanto conhecer a comunidade microbiana nas doenças endodônticas é conhecer também seus fatores de virulência, uma vez que, juntos, são potentes agentes capazes de desencadear e manter um processo inflamatório na região periapical.

Nesse contexto, estando constantemente presentes em infecções endodônticas primárias, as bactérias Gram-negativas apresentam como principal

constituente de membrana externa os lipopolissacarídeos (LPS), também denominados de endotoxinas, sendo liberados durante a multiplicação ou morte bacteriana (Gomes *et al.*, 1994; Siqueira *et al.*, 2001; Jacinto *et al.*, 2003; Gomes *et al.*, 2004; Sakamoto *et al.*, 2006; Martinho *et al.*, 2010).

Devido ao elevado peso molecular, o LPS é sem dúvida um dos maiores produtos liberados pelas bactérias (Nissan *et al.*, 1995). Esta molécula tem a habilidade de atravessar a dentina, e atingir uma profundidade quatro vezes maior no interior dos túbulos dentinários do que a própria bactéria (Berkiten *et al.*, 2000; Gomes *et al.*, 2009). Isto sugere que todos os produtos bacterianos são potencialmente capazes de alcançar a polpa (Nissan *et al.*, 1995).

Quimicamente, lipopolissacarídeos são constituídos de uma porção "Lípideo A", Core oligossacarídeo (polissacarídeos) e Antígeno O. A porção "Lípideo A" exerce a maior parte das atividades endotóxicas, a qual é referida como princípio endotóxico do LPS (Dixon & Darveau, 2005). A estrutura química do lipídeo A é composta por ácidos gráxos com 15 a 17 átomos de carbono, ligados a duas moléculas de amino-açúcares (glicosaminas), à qual ligam-se dois radicais fosfatos, e a estes liga-se um resíduo de proteína. As posições dos radicais fosfato, assim como o número, tipo e sítio de ligações parecem determinar o potencial inflamatório dos diferentes lipopolissacarídeos (Rietschel & Brade, 1992).

O organismo está apto a detectar pequenas quantidades de LPS circulante. O reconhecimento do LPS se dá por meio do lipídeo A, que por sua vez, ativa diferentes vias de sinalização intracelular através de sua ligação a receptores próprios. Os principais estão localizados na membrana celular de monócitos,

denominados receptores Toll-like 4 (TLR4) (Wilson *et al.*, 1996; Beutler & Poltorak, 2000).

Desde sua descoberta, no final da década de 1990, os receptores do tipo Toll-like têm sido identificados como sensores primários de infecções bacterianas e permitido avanços significativos na compreensão dos mecanismos envolvidos na imunidade inata e adquirida (Coats *et al.*, 2009).

Uma das principais vias ativadas pelo LPS é a via do fator de transcrição NFkB (do inglês, Nuclear Factor kappa B) que ao se translocar ao núcleo, promove a transcrição de diversos genes que participam de processos fisiológicos e patológicos (Raetz & Whitfield, 2002), que vai desde a uma reação inflamatória (Khabbaz *et al.*, 2000, Coats *et al.*, 2009; Jain *et al.*, 2013, To *et al.*, 2015) à reabsorção dos tecidos mineralizados (Mattison *et al.*, 1987; Rietschel *et al.*, 1992; Stashenko, 1993) com o intuito de eliminar o agente agressor.

O conhecimento mais aprofundado sobre o binômio estrutura-função do LPS e sua porção bioativa, o lipídeo A, revolucionou os conceitos sobre seu mecanismo de ação e formas de inativação. Estudos revelam que o lipídeo A pode variar entre as diferentes espécies bacterianas, de acordo com o número de grupo de fosfatos, quantidade e a posição de ácidos graxos na molécula (Bainbridge *et al.*, 2002; Darveau *et al.*, 2004, To *et al.*, 2015). Mudanças no micro-ambiente, tais como, a concentração de hemina e temperatura, podem alterar estruturalmente esta porção bioativa (Al-Qutub *et al.*, 2006). Conseqüentemente, modificações sutis na estrutura do lipídeo A, tais como, alteração do número, posição, ou comprimento de ácidos graxos estão intimamente relacionadas à alteração da

sinalização via TLR4 e conseqüentemente de seus efeitos imunoestimuladores (Hajjar *et al.*, 2002, Jain *et al.*, 2013, To *et al.*, 2015).

LPSs são capazes de estimular a liberação de citocinas pró- inflamatórias, tais como IL1- α , IL1- β , IL6, IL10, TNF- α e PGE2 por diferentes linhagens celulares (Wilson *et al.*, 1996), através de receptores do tipo TLR-4 (Hong *et al.*, 2004; Mattison *et al.*, 1987). Assim, monitorar os níveis de citocinas pró-inflamatórias na modulação da resposta imune frente às infecções endodônticas é importante para um melhor entendimento da patogênese pulpar e perirradicular e interpretação das manifestações clínicas da periodontite apical de origem endodôntica.

Níveis teciduais elevados indicam a progressão do tecido inflamado para a necrose (Ashida *et al.* 2011). Martinho *et al.* (2012) verificaram que os níveis mais elevados de endotoxinas foram seguidos por um conseqüente aumento da produção de IL-1 β , principalmente em dentes com uma maior área de reabsorção óssea junto aos tecidos periapicais.

Por meio de diversos estudos clínicos de quantificação de endotoxinas em canais radiculares foi possível conhecer o papel desta molécula nas doenças pulpares e perirradiculares (Schein & Schilder, 1975; Horiba *et al.*, 1991; Khabbaz *et al.*, 2001; Jacinto *et al.*, 2005; Vianna *et al.*, 2007; Martinho & Gomes, 2008; Gomes *et al.*, 2009; Martinho *et al.*, 2010; 2011; Endo *et al.*, 2012; Gomes *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2012).

Considerando o estímulo nocivo do LPS aos tecidos periapicais, estratégias clínicas devem ser voltadas não apenas para máxima desagregação/redução da

carga microbiana, mas também para eliminação ou neutralização de LPSs e demais produtos bacterianos tóxicos.

Já está bem consolidada na literatura a efetividade do preparo químico-mecânico na redução de microrganismos, demonstrando a suscetibilidade destes aos agentes antimicrobianos comumente utilizados na terapia endodôntica. Em contrapartida, considerando a adesão do LPSs aos tecidos mineralizados, particularmente na região apical (Schein & Schilder, 2006), o mesmo êxito não era alcançado para redução de endotoxinas de canais infectados.

Através da instrumentação manual, os estudos de Vianna *et al.* (2007) e Gomes *et al.* (2009) comprovaram a ineficácia do preparo químico-mecânico na redução de endotoxinas de canais radiculares infectados, quando estabelecido o limite apical de trabalho 1 mm aquém do comprimento real do dente. Desta forma, níveis residuais elevados de endotoxinas permaneciam no interior do canal radicular. Em 2010, Martinho *et al.* realizaram um estudo que contribuiu expressivamente para a instituição de uma abordagem terapêutica mais eficaz na redução de LPS de canais radiculares infectados. Os autores demonstraram uma redução de 98% do conteúdo de endotoxinas quando o preparo do canal foi realizado na sua completa extensão associado à instrumentação rotatória. Esse achado foi encontrado mesmo utilizando uma substância inerte nos procedimentos de irrigação (solução salina-NaCl 0,9%), o que reafirmou o papel mecânico do alargamento do canal radicular associado ao ato físico de irrigação-aspiração gerando forças friccionais na parede do canal radicular.

Anos depois, Marinho *et al.* (2012) demonstraram que o diâmetro apical

final de alargamento do canal radicular exerce influência direta na redução de endotoxinas de canais radiculares contaminados.

Na prática endodôntica moderna, a instrumentação dos canais radiculares com sistemas rotatórios reciprocantes de lima única tem sido cada vez mais utilizada, uma vez que reduz o tempo de preparo e a fadiga do operador quando comparada com a instrumentação rotatória (Berutti et al., 2012).

O sistema reciprocante de instrumentação rotatória Reciproc (VDW, Munique, Alemanha) é baseado no conceito de preparo com instrumento único. Este instrumento é fabricado com a liga M-Wire, que apresenta maior flexibilidade e resistência à fadiga cíclica do que a liga convencional de NiTi e sua parte ativa apresenta conicidade variada que diminui progressivamente até o intermediário (Webber et al., 2011; Burklein et al., 2012; Berutti et al., 2011; Berutti et al., 2012; Versiani et al., 2013, Ribeiro et al., 2014).

Até o momento, os estudos disponíveis têm mostrado que, em comparação com os sistemas rotatórios convencionais, o Reciproc apresenta similaridades quanto à remoção de debris e da camada de *smear layer*, sendo capaz de manter o eixo original de canais curvos durante o preparo químico-mecânico (Silva et al. 2016, Versiani, 2012, Ribeiro et al., 2014). Entretanto, se faz importante determinar se o número de limas utilizadas para alargamento foraminal é relevante para redução de endotoxinas de canais radiculares contaminados, determinando a efetividade do sistema Reciproc na descontaminação de canais radiculares.

Embora LPS tenha sua concentração reduzida imediatamente após a

limpeza e modelagem do canal radicular, trabalhos clínicos demonstraram que até o momento, não há nenhuma técnica que seja completamente eficaz para sua eliminação (Endo *et al.*, 2013, Marinho *et al.*, 2014, Melo *et al.*, 2016). Isto justifica a busca de uma substância química auxiliar dotada de atividade antimicrobiana e detoxificante com o intuito de contribuir para redução dos níveis de endotoxinas presentes em infecções endodônticas e também na sua neutralização..

Pesquisas têm mostrado a atividade antimicrobiana de amplo espectro das substâncias químicas auxiliares: hipoclorito de sódio e clorexidina, em diferentes concentrações sobre bactérias vegetativas, esporos bacterianos, fungos, protozoários e vírus (Gomes *et al.*, 2001, Rôças *et al.*, 2016). Limitados números de estudos *in vivo* demonstraram a eficácia das substâncias químicas auxiliares, associada ao fluxo-refluxo da irrigação, na redução do conteúdo de endotoxinas (Vianna *et al.*, 2007; Martinho & Gomes, 2008; Gomes *et al.*, 2009; Martinho *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2012, Marinho *et al.*, 2014). Mais ainda, pouco se sabe a respeito da real ação química destas substâncias na molécula de LPS na ausência de fluxo- refluxo. Faz-se importante diferenciar habilidade de redução de LPS devido ao fluxo-refluxo do irrigante no interior do canal do efeito químico da substância na degradação da molécula do LPS. Tal fato ainda não tinha sido avaliado na Endodontia.

Com o objetivo de aprimorar os procedimentos de desinfecção e, conseqüentemente, elevar as taxas de sucesso no tratamento endodôntico, tem-se buscado alternativas para potencialização da redução de endotoxinas dos canais radiculares infectados. Assim, o uso de uma medicação intracanal entre

sessões vem sendo investigado, com o objetivo de reduzir a carga de endotoxinas residuais, principalmente em túbulos dentinários (Vianna *et al.*, 2007; Trope & Debelian, 2009; Rahimi *et al.*, 2014; Sousa *et al.*, 2014; Teles *et al.*, 2014). Ainda não está totalmente elucidado quão bioativo é o LPS após contato com diferentes substâncias químicas auxiliares, bem como com uma medicação à base de hidróxido de cálcio, em relação a produção de citocinas pró-inflamatórias e ativação dos receptores TLR-4. Portanto, o estudo dos elementos constituintes, bem como dos mecanismos destrutivos da resposta imune, pode proporcionar o entendimento da formação das lesões periapicais.

Para a quantificação de endotoxina nos canais radiculares foi utilizado o teste turbidimétrico Pyrogent 5000[®] (BioWhittaker, Inc, Walkersville, MD, USA) utilizando a técnica do *Limulus Amebocyte Lysate* (LAL). Sabe-se que os canais radiculares podem conter exsudatos com colorações diferentes (i.e. hemorrágico, purulento, claro, etc), assim como existem diferentes formulações de substâncias químicas auxiliares e medicações intracanaís. Desta maneira é importante validar se o método LAL não sofre interferência na presença de substâncias químicas auxiliares, medicações intracanaís e nas diferentes condições clínicas dos canais radiculares, sendo este um dos objetivos do nosso trabalho. Tal investigação ainda não tinha sido reportada na literatura endodôntica.

O presente trabalho visou realizar a identificação/quantificação bacteriana, quantificação de endotoxinas (LPS) e avaliação do potencial imunoestimulador do conteúdo infeccioso endodôntico para se obter um maior entendimento da infecção endodôntica primária.

Visou verificar se a combinação de novas tecnologias de instrumentação dos canais radiculares, com o uso de diferentes substâncias químicas auxiliares e medicação intracanal reduziria a carga infecciosa/endotóxica presentes nestes canais.

Além disso, visou investigar a influência das substâncias químicas auxiliares e da medicação à base de hidróxido de cálcio, sobre a estrutura e bioatividade do lipopolissacarídeo bacteriano; e posteriormente avaliar seu potencial imunestimulador em receptores TLR-4. Tudo isso foi realizado com o objetivo de acrescentar conhecimento na patobiologia do LPS nas infecções endodônticas e verificar sua suscetibilidade a diferentes modalidades terapêuticas, sendo uma pesquisa inédita na endodontia.

Estudos clínicos como o presente, são necessários e devem ser realizados para confirmar a superioridade dos novos sistemas de limpeza dos canais radiculares, métodos e substâncias em relação aos convencionais de maneira a aumentar a desinfecção destes canais e conseqüentemente acelerar o processo de reparo dos tecidos perirradiculares.

Sendo assim os principais objetivos deste trabalho foram: **1)** Investigar a influência da interação entre substâncias antimicrobianas utilizadas na terapia endodôntica e o substrato *Limulus Amebocyte Lysate* (LAL) para quantificação de endotoxinas, com o objetivo de identificar substâncias interferentes na leitura dos níveis de endotoxinas em amostras clínicas (**artigo 1**); **2)** Estudar o perfil da microbiota e níveis de endotoxinas nas infecções endodônticas primárias com lesão periapical, determinando o potencial inflamatório do conteúdo endodôntico

contra macrófagos através da produção de IL1- β e TNF- α . Além disso, comparar “*in vivo*” a efetividade do preparo químico-mecânico (PQM) com NaOCl 2,5% e Clorexidina (CHX) gel 2% e após o uso do EDTA 17% e medicação intracanal na eliminação de LPS, tendo como controle, soro fisiológico (**artigo 2**); **3**) Avaliar a efetividade do sistema de instrumentação recíprocante de lima única, Reciproc R25, em comparação com sistemas rotatórios convencionais de limas múltiplas, na remoção de bactérias e endotoxinas de canais radiculares contaminados (**artigo 3**); **4**) Monitorar “*in vivo*” a efetividade do preparo químico-mecânico (PQM) com NaOCl 2,5% e Clorexidina (CHX) gel 2% (tendo como controle o soro fisiológico [SS]), após o uso do EDTA 17% e uso do hidróxido de cálcio por 30 dias, como medicação intracanal, elucidando a contribuição de cada etapa da terapia endodôntica na redução de endotoxinas (**artigo 4**); **5**) Investigar a influência das substâncias químicas auxiliares da terapia endodôntica e da medicação à base de hidróxido de cálcio na estrutura e bioatividade do lipopolissacarídeo bacteriano, visando elucidar a ocorrência de possíveis implicações na detecção do lipídeo A/ LPS e posteriormente, seu potencial imunostimulador em receptores TLR-4 (**artigo 5**).

2 ARTIGOS

2.1 Artigo 1- Accuracy of Turbidimetric Limulus Amebocyte Lysate Assay for the recovery of endotoxin interacted with commonly used antimicrobial agents of endodontic therapy

Artigo aceito para publicação no periódico Journal of Endodontics 2015 Oct;41(10):1653-9. doi: 10.1016/j.joen.2015.05.020.

Marinho AC, Polay AR, Gomes BP.

ABSTRACT

Introduction: This study was conducted to investigate whether the interaction between the turbidimetric Limulus Amebocyte Lysate (LAL) substrate for endotoxin measurement and the substances/antimicrobial agents used in endodontic therapy can lead to inhibition/enhancement of endotoxin recovery. **Methods:** 10 µl of a suspension of *Escherichia coli* endotoxin (O55:B55) were inoculated and kept in contact for 1 hour with different substances categorized as the following: GI- auxiliary chemical substances: 5.25% and 2.5% sodium hypochlorite solutions (NaOCl); 2% chlorhexidine (CHX) (gel and solution); 1% natrosol gel; 17% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA); 10% citric acid; 3% hydrogen peroxide; 5% sodium thiosulphate; and 0.5% Tween 80 associated with 0.07% soy lecithin; GII- Intracanal medications: neomycin-polymyxin B-hydrocortisone (Otosporin®); calcium hydroxide [(Ca(OH)₂]; Ca(OH)₂ + 2% CHX gel; Ca(OH)₂ + 2% CHX gel + zinc oxide eugenol (ZOE); Ca(OH)₂ + camphorated paramonochlorophenol (Calen®); triple antibiotic paste; mineral trioxide aggregate (MTA®) and iodoform.

Positive and negative controls consisted of root canal hemorrhagic exudate and pyrogen-free sterile water, respectively. All samples were diluted up to 10^{-4} . Each dilution was individually examined by the turbidimetric kinetic Limulus Amebocyte Lysate assay. Collected data were analyzed through performance characteristics of the LAL assay such as linearity, coefficient of variation percentage (CV%), and product positive control (PPC) values. **Results:** Correlation coefficient (≥ 0.980) and CV% ($< 10\%$) of the standard curve in duplicate showed the tests' linearity. Spike recovery of auxiliary chemical substances achieved PPC values ranging from 50 to 197%, demonstrating no interferences with LAL substrate. Conversely, 3% hydrogen peroxide achieved product inhibition, in which endotoxin values were underestimated even after the dilution of 10^{-4} . Regarding intracanal medicaments, neomycin-polymyxin B-hydrocortisone also inhibited endotoxin detection in all dilutions investigated (PPC values $< 50\%$). In contrast, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + 2% CHX gel + ZOE, as well as triple antibiotic paste, led to enhancement of endotoxin detection, in which endotoxin values could not be validated by the turbidimetric kinetic LAL assay (PPC value $> 200\%$). **Conclusion:** The performance characteristics of kinetic turbidimetric assay for endotoxin measurement, such as precision and reproducibility, are modulated by the interaction of the LAL substrate with the substances/antimicrobial agents used in endodontic therapy.

Key-words: Endotoxin, Limulus Amebocyte Lysate methods, root canal.

INTRODUCTION

Endotoxin or bacterial lipopolysaccharide (LPS) is a general virulence factor present in the outer membrane of Gram-negative bacteria predominantly involved in root canal infection (1,2). Bacterial cells only secrete small amounts of LPS during multiplication; however, substantial amounts may be released during the destruction of the cells by antimicrobial substances or host immune cells (3). The presence of LPS in infected root canals has been consistently reported in clinical studies revealing its dose-dependent association with the presence of clinical and radiographic features of endodontic disease (1-6).

To date, endotoxin detection can be carried out by several methods (7-9). The rabbit pyrogen test was the first assay developed to test solutions intended for injection into humans. This test indicates the presence of endotoxin which can cause a fever in rabbits and is sensitive to 0.5 Endotoxin Units (EU)/mL (7,10,11). It is generally accepted that one EU equals approximately 0.1-0.2 ng EU/mL (12). Later, in the 1970s, an in vitro quantitative assay was developed using a lysate – a basic substrate of the LAL test – produced by lysis of amoebocytes from the horseshoe crab (*Limulus polyphemus*). The lysate contains a mixture of proteins that clots in the presence of very low levels of endotoxins (7,10). Ever since, Limulus Amebocyte Lysate (LAL) is recognized as the standard assay for detection of endotoxins according to the US Food and Drug Administration guidelines for medical devices and parenteral drugs (12).

Besides investigation of LPS in infected root canals (8–13), endodontic researchers have also attempted to evaluate the effect of root canal procedures on its elimination (8, 14–16) by using Limulus Amebocyte Lysate (LAL) with a variety of improved methods such as the chromogenic endpoint (QCL-1000™ test, detection limit: 0.1-1 EU/mL endotoxin unit/mL [EU/mL]) (3,13-16) and kinetic chromogenic (Kinetic-QCL™ test, detection limit: 0.005-50 EU/mL) assays (17-19), both determining the levels of endotoxin by yellow color intensity; and the kinetic turbidimetric assay (20-22) (turbidimetric test, detection limit: 0.01-100), which is based on a turbid reaction (coagulogen-based LAL assay). Martinho et al (23) demonstrated that quantitative kinetic turbidimetric and kinetic chromogenic LAL methods are best suited for the analysis of endotoxins in root canal infection, both being more precise and allowing better reproducibility compared with the endpoint chromogenic assay.

Regardless of the method used, LAL-based assays contain a series of coagulation enzymes in which the pH, temperature and ionic strength have a critical influence over the precise biochemical reactions to ensure the proper development of the serine protease catalytic coagulation cascade (24). Considering that a wide variety of antimicrobial agents have been tested for root canal detoxification, either in one-visit or multiple-visit treatment (13,15,16,18-20,22), the interaction between LAL substrate and components of the test sample can interfere with any step of the coagulation cascade to an extent that the lysate is rendered insensitive or overreacts to endotoxin. Negative or underestimated results related to samples that inhibit the LAL test do not necessarily indicate the

absence of or low level of endotoxin. The same is relevant for enhanced activity of Limulus coagulation cascade due to the cross-interaction mediated by additional presence of interferences. Consequently, misleading results are expressed by the performance characteristics of the LAL assay.

Once validation criteria is established (a key element in endotoxin testing), it would be of interest to investigate the ability of LAL substrate in detecting endotoxins when interacted with auxiliary chemical substances and intracanal medicaments of endodontic therapy. Reports about whether such associations are able to impair the accuracy of LAL substrate in detecting endotoxins have not been published so far. Therefore, this study was conducted to investigate whether the interaction between commonly used substances/antimicrobial agents of endodontic therapy and turbidimetric Limulus Amebocyte Lysate substrate lead to inhibition/enhancement of endotoxin recovery.

MATERIAL AND METHODS

Exposure of endotoxin to selected substances

The study was approved by the local Institutional Ethics Committee (Protocol n°186/09). *Escherichia coli* O55:B5 endotoxin (Lonza, Walkersville, MD, USA) was used for the experiments. Under sterile laminar flow, 50 µL of a standard solution containing endotoxin (1 EU/ml) was inoculated into different endodontic antimicrobial agents selected from those commonly used clinically, as follows:

- **GI-auxiliary chemical substances:** 5.25% sodium hypochlorite (NaOCl); 2% chlorhexidine (CHX) gel [gel base: 1% natrosol (hydroxyethyl cellulose)] and solution; 1% natrosol gel; 17% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA); 10% citric acid; 3% hydrogen peroxide; 5% sodium thiosulphate (NaOCl neutralizer); and 0.5% Tween 80 associated with 0.07% soy lecithin (CHX neutralizer). All substances were provided by Drogal Chemicals and Pharmaceuticals Ltd., Piracicaba, SP, Brazil.
- **GII-Intracanal medicaments:** Neomycin-polymyxin B-hydrocortisone (Otosporin®, Glaxo Wellcome, Rio de Janeiro, RJ, Brazil); calcium hydroxide [(Ca(OH)₂ p.a] (Biodinâmica Chemicals and Pharmaceuticals Ltd., Ibiporã, PR, Brazil); Ca(OH)₂ combined with 2% CHX gel (1: 1; v:v); Ca(OH)₂ combined with camphorated paramonochlorophenol (Calen®, S.S. White, Rio de Janeiro, RJ, Brazil); Ca(OH)₂ combined with 2% CHX gel and zinc oxide eugenol (1: 1: 0.01 v:v:v) (ZOE, Biodinâmica Chemicals and Pharmaceuticals Ltd., Ibiporã, PR, Brazil); triple antibiotic paste; mineral trioxide aggregate (ProRoot MTA®, Dentsply, Tulsa, OK, USA); and iodoform (Biodinâmica Chemicals and Pharmaceuticals Ltd., Ibiporã, PR, Brazil).

Auxiliary chemical substances were prepared 24 hours before the beginning of the experiment. Before inoculation of the endotoxin, 1 mL of each auxiliary chemical substance and the ready-to-use formulations of intracanal medication, neomycin-polymyxin B-hydrocortisone (Otosporin®) as well as Ca(OH)₂ combined

with camphorated paramonochlorophenol (Calen®), were transferred to glass test tubes.

For powder substances, such as calcium hydroxide, mineral trioxide aggregate and iodoform, 1g of each one was individually mixed with 1 mL of LAL Reagent Water (Lonza, Walkersville, MD, USA). Ca(OH)_2 associated with 2% CHX gel was mixed in a 1:1 proportion. For the mixture of Ca(OH)_2 + 2% CHX gel and zinc oxide eugenol, a 1: 1: 0.01 proportion was used for the mixture according to Soares et al (25).

Triple antibiotic paste (TA) was prepared by crushing of antibiotic ciprofloxacin (Ciplox, Drogal Chemicals and Pharmaceuticals Ltd., Piracicaba, SP, Brazil), metronidazole (Metrogyl, Drogal Chemicals and Pharmaceuticals Ltd., Piracicaba, SP, Brazil), and minocycline (Minoz, Drogal Chemicals and Pharmaceuticals Ltd., Piracicaba, SP, Brazil) tablets separately using a mortar and pestle. The crushed powder was passed through a fine sieve to remove heavy filler particles and obtain a fine powder. The ciprofloxacin, metronidazole, and minocycline powders were weighed separately and mixed in a 1:1:1 proportion, respectively, to obtain TA mixture. A total of 300 mg of the antibiotic mixture was mixed with 1mL of pyrogen-free water.

Negative control was performed by the inoculation of endotoxin into 1mL of pyrogen-free water. Positive control consisted of root canal hemorrhagic exudate collected from root canals of teeth with irreversible pulpitis, as described elsewhere (3,15,16,22). The pH of all samples was measured right after preparation by using a pH meter (Procyon, digital pH meter model AS 720, electrode A 11489, Procy

Instrumental Científica, São Paulo, SP, Brazil). All test tubes were vortexed for 5 minutes to ensure complete mixture and diluted with pyrogen-free water by 10-fold serial dilution up to 10^{-4} . All the glassware was rendered pyrogen-free via heat treatment at 200°C for 4 h (26). Pyrogen-free pipettes (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA) were used for all procedures. All samples were left for 1 hour under constant agitation in an orbital shaker platform (Fanem, São Paulo, SP, Brazil). Following the incubation period, each substance as well as its respective dilutions were assessed for further LAL assays.

Endotoxin recovery assay

Limulus Amebocyte Lysate (LAL) was used as a quantitative test for LPS and was carried out according to the manufacturer's protocol (Turbidimetric test – PYROGENT™-5000, Lonza, Walkersville, MD, USA).

Sample dilutions were performed according to the Maximum Valid Dilution (MVD) value, in which at least three batches of each product should be tested for inhibition and enhancement (12). Moreover, all validation tests should be accomplished on undiluted substance or on an appropriate dilution.

As a parameter for calculation of the endotoxin levels present in the samples, a standard curve was plotted by using a known endotoxin concentration supplied by the kit (100 EU/mL), with its dilutions reaching the final concentrations (0.01, 0.1, 1, 10 EU/mL). A 96-well microplate (Corning Costar, Cambridge, MA, USA) was placed on a heating block at 37°C and maintained at this temperature throughout the assay. Firstly, 100 µL of the blank, followed by the same volume of the

standard endotoxin solutions (0.01, 0.1, 1, 10 EU/mL) and 100 μ L of the samples, were added in duplicate to the 96-well microplate. To verify test specificity, which is the ability to detect endotoxin in the presence of interfering substances, we evaluated the spike recovery for each sample and their respective dilutions. For this, all samples were accompanied by a positive product control (PPC) consisting of a known concentration of endotoxin (0.5 EU/ml) added into each sample. To evaluate assay accuracy, the test included plating each sample in triplicate. All samples were mixed with the reconstituted LAL reagent, placed in a photometer, and automatically monitored over time until turbidity appeared. Both unspiked and spiked samples (control) had their endotoxin concentrations automatically calculated. The time required for the appearance of turbidity (reaction time) is inversely proportional to the amount of endotoxin. The absorbance of endotoxins was continuously measured at 340 nm throughout the assay using an enzyme-linked immunosorbent assay plate reader (ELX 808, Biotek Instruments Winooski, VT USA). During calculation of the endotoxin concentration, the microplate reader with WinKQCL™ Software (Lonza, Walkersville, MD, USA) monitored the absorbance of each microplate well. The WinKQCL™ Software automatically performed a log/log linear correlation of the reaction time of each standard curve calculating the PPC values of spike recovery samples in comparison with the unknown amount of endotoxin.

Descriptive data analysis

Collected data were typed onto a spreadsheet and presented in a descriptive analysis of performance characteristics of turbidimetric test such as linearity, coefficient of variation percentage (CV%) and product positive control (PPC) values. The LAL assay was considered valid by the following: the standard curve with coefficient of variation (CV%) among replicates less than 10%, correlation coefficient ≥ 0.980 and endotoxin range values between 0.01 EU/ml – 1 EU/ml. Spike recovery must be equal to the known concentration of the spike procedure within 50% - 200% to neither inhibit nor enhance the assay. On the other hand, interference between LAL substrate and antimicrobial agents samples with their respective dilutions was demonstrated by PPC values $<50\%$ (inhibition) or $> 200\%$ (enhancement), according to the manufacturer's instructions.

RESULTS

Table 1 provides an overview of the pH of the tested substances, their coefficient of variation, PPC values and endotoxin levels throughout the assay. It also shows if the interaction between these substances and the LAL substrate inhibited or enhanced the endotoxin recovery. Absolute value of correlation coefficient of the standard curve of ≥ 0.980 and CV% $<10\%$ demonstrated the test's linearity. Figure 1 shows an overview of the inhibition/enhancement of the tested substances with the turbidimetric LAL substrate.

Regarding the positive control, hemorrhagic exudate achieved PPC values ranging from 210% to 296%, and its endotoxin values were overrated even after

the dilution of 10^{-4} (8.7- 14.02 EU/mL). Concerning the negative control, pyrogen-free water achieved PPC values of ~100% (standard validation according to the Guideline on validation of the Limulus Amebocyte Lysate test).

Spike recovery values of the auxiliary chemical substances demonstrated no interferences with LAL substrate (PPC values ranged from 50 to 197%). Conversely, product inhibition was found in 3% hydrogen peroxide (PPC value ranging from 24% to 36%). Likewise, neomycin-polymyxin B-hydrocortisone (Otosporin®) also led to product inhibition (PPC values: 14 to 27%), underestimating endotoxin values in all dilutions. Enhancement of endotoxin detection was indicated by the association of Ca(OH)_2 + 2% CHX gel + ZOE as well as by triple antibiotic paste. In these samples, endotoxin recovery values could not be validated by the turbidimetric kinetic LAL assay (PPC value >200%).

DISCUSSION

The present study gathered validation data to support the cross-interaction between widely used substances in endodontic therapy and the LAL assay for quantification of endotoxins. Several studies have been performed focusing on the effectiveness of endodontic procedures in the elimination of endotoxins (13,15,16,18-20,22). Therefore, the accuracy of the Limulus Amebocyte Lysate assay plays an important role for the establishment of reliable protocols for root canal detoxification.

The enzyme-mediated LAL reaction is triggered by the presence of endotoxins, which activates a proenzyme of the catalytic coagulation cascade of the LAL in a dose-dependent manner (10, 24). The activated enzyme named Coagulase hydrolyzes specific bonds within a clotting protein (Coagulogen) also present in the LAL. Once hydrolyzed, the resultant coagulin self-associates and forms a gelatinous clot. The turbidimetric LAL assay measures the increase in the turbidity that precedes the formation of the gel clot. In turn, the strength of the turbidity resulting from the coagulogen conversion is correlated with the endotoxin concentration (10, 24). A single-reagent assay provided by turbidimetric assay seems to improve the precision, speed and accuracy of the test over multi-reagent chromogenic tests (23, 24).

In the present study, hemorrhagic exudate (positive control) showed enhancement of endotoxin detection, as expected. This is due to cross-reactivity between blood and its components, such as proteins and cofactors including thrombin, thromboplastin, synthetic polynucleotides, β -glucans from Gram-positive bacteria, polysaccharides including yeast mannans, bacterial dextrans and dithiols. Hochstein et al (29) have demonstrated the role of blood derivatives as endotoxin binding competitors that activate LAL to give a false positive test for pyrogen (27-29).

Based on the overall reading of the endotoxin concentration, we demonstrated that turbidimetric test (PYROGENT™-5000), which presents a wide range of detection (0.01 to 100 EU/mL), is both sensitive and suitable for the recovery of minimal amounts of endotoxin coming in contact with endodontic

irrigants such as NaOCl and CHX, chelating agents, including EDTA and citric acid, as well as neutralizer substances, particularly those used before root canal sampling procedures such as sodium thiosulphate and also Tween 80 associated with soy lecithin.

Conversely, 3% hydrogen peroxide achieved inhibition of endotoxin detection as shown by PPC values ranging from 24% to 36%, resulting in non-validated endotoxin recovery. It seems reasonable to assume that substances that naturally present turbidity may decrease the accuracy of the test in detecting endotoxins. Because the turbidity can interfere in the endotoxin measurement, serial dilution is required in order to determine the product dilution considered non-inhibitory by means of PPC values (12). In the present study, the endotoxin values were underestimated even after the dilution of 10^{-4} . Another important factor for proper LAL reaction is the pH. The pH value between 6.0 to 8.0 is considered ideal for good interaction among samples and LAL substrate (30, 31). For hydrogen peroxide, besides turbidity, the pH of 2.6 might influence the recovery of endotoxins.

Clinical studies have been evaluating the effect of intracanal medicaments on the reduction of endotoxins (15, 32-34). The present study also attempted to demonstrate the turbidimetric test suitability for routine processing and validation of endotoxin recovery after the interaction with intracanal medicaments.

One of the tested medicaments was the combination of neomycin-polymyxin B- hydrocortisone, named Otosporin®. This short-term intracanal medication used in cases of pulp and periapical inflammatory processes, led to inhibition of

endotoxin detection. Polymyxin B, present in this formulation, has the ability to bind with high affinity to the Lipid A portion of the LPS, altering the three-dimensional conformation of the molecule (35). This conformational alteration caused by the complex endotoxin–polymyxin B might impair the occurrence of the events of the serine protease catalytic coagulation cascade, which is activated by LPS therefore underestimating the endotoxin levels.

Calcium hydroxide has been proven to be useful and beneficial as intracanal medicament against endotoxins based on its alkaline pH of 10–12 (15, 32-34). In addition, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ neutralizes LPS molecule by hydrolysis of the ester bonds in the lipid A chains (15, 32-34). In this study, LAL substrate interaction with calcium hydroxide samples (either mixed with pyrogen-free water or 2% chlorhexidine gel) resulted in the enhancement of the endotoxin levels. The most important factor for LAL coagulation activity is probable the formation of lipid A complexes due to its amphipathic characteristics (36). It was reported that $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ability in causing disruption of lipid A complexes coincides with the reduction of LAL coagulation activity (36). Hence, it seems reasonable to identify this substance as an influential interfering substance for the formation of LAL coagulation cascade, as it affects the lipid A recognition. Interestingly, MTA® samples achieved the same outcome, proving possible to overcome product enhancement only after serial dilutions.

$\text{Ca}(\text{OH})_2$ and 2% CHX gel mixed with zinc oxide paste is currently used in endodontic therapy when increased radiopacity is desired, improving the ability of the paste to be detected inside the root canal (25). Our data showed that after exposure with this medication, the endotoxin values could not be determined by

the turbidimetric kinetic LAL assay. The same happened with the analysis of triple antibiotic mixture samples (PPC value >200% in all dilutions). Recently, it was reported that metal ions, antibiotics, and anticancer drugs directly affect endotoxins and produce a strong interfering action in their detection (36). The detailed mechanism of these interference events with the LAL coagulation activity remains unclear. Taken together, this finding suggests that samples that possess significant turbidity on their own such as $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + 2% CHX gel+ zinc oxide or triple antibiotic paste may also require clarification prior to testing. Clarification may be achieved by centrifugation or filtration to remove nanoparticles that might interfere with spectrophotometric detection (8,19). Root canal perforation, root resorption, trauma, incomplete root formation or pulp revascularization may indicate the need for medicament associations with increased antimicrobial efficacy and also to avoid the replacement of the interappointment dressings (25,32,33). Nevertheless, future studies must take into consideration the interfering interaction among these substances and the LAL substrate when quantification of endotoxins is desired.

Overall, our findings demonstrated that not all substances greatly interacted with the turbidimetric kinetic LAL test. The degree of inhibition or enhancement of endotoxin detection is dependent upon the concentration of the substance interacted with the LAL substrate, once sample dilutions contributed for the recovery of endotoxins. However, when considering multifold dilutions, not only is the concentration of endotoxin diluted but also the sensitivity of the LAL test is affected (12, 24). If several concentrations of the same product need to be assayed, it is necessary to establish performance characteristics for each one

independently. Presumably, a good strategy in cases of no validation of endotoxin recovery by using the kinetic turbidimetric test, especially with samples with natural turbidity, would be to analyze interfering samples with the kinetic chromogenic LAL technique. However, the high cost and time required to complete the analysis with the multi-reagent chromogenic test must be taken into account.

In conclusion, this study has revealed that the performance characteristics of the kinetic turbidimetric assay for endotoxin measurement, such as precision and reproducibility, are modulated by the interaction of the LAL substrate with the substances used in endodontic therapy.

REFERENCES

1. Hong CY, Lin SK, Kok SH, Cheng SL, Lee MS, Wang TM, Chen CS, Lin LD, Wang JS. The role of lipopolysaccharide in infectious bone resorption of periapical lesion. *J Oral Pathol Med* 2004; 33:162-9.
2. Horiba N, Maekawa Y, Abe Y, Ito M, Matsumoto T, Nakamura H. Correlations between endotoxin and clinical symptoms or radiolucent areas in infected root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1991; 71: 492-5.
3. 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; 54: 777-83.
4. Fiske MJ, Fredenburg RA, VanDerMeid KR, McMichael JC, Arumugham R. Method for reducing endotoxin in *Moraxella catarrhalis* UspA2 protein preparations. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2001;753:269-78.
5. Lim GC, Torabinejad M, Kettering J, et al. Interleukin 1- β in symptomatic and asymptomatic human periradicular lesions. *J Endod* 1994;20:225-7.

6. Burton AJ, Carter HE. Purification and characterization of the lipid A component of the lipopolysaccharides from *Escherichia Coli*. *Biochemistry* 1964; 3: 411-8.
7. Levin J, Bang FB. Clottable protein in *Limulus*; its localization and kinetics of its coagulation by endotoxin. *Thromb Diath Haemorrh* 1968;19:186-97.
8. Solum NO. The coagulogen of *Limulus polyphemus* hemocytes. A comparison of the clotted forms of the molecule. *Thromb Res* 1973;2:55-70.
9. Young NS, Levin J, Prendergast RA. An invertebrate coagulation system activated by endotoxin: evidence for enzymatic mediation. *J Clin Invest* 1972;51:1790-7.
10. Hurley JC. Endotoxemia: methods of detection and clinical correlates. *Clin Microbiol Rev* 1995;8:268-92.
11. Schein B, Schilder H. Endotoxin content in endodontically involved teeth. *J Endod* 2006; 32: 293-5.
12. US Department of Health and Human Services. Public Health Service. Food and Drug Administration. Guideline on validation of the *Limulus* Amebocyte Lysate test as an end-product endotoxin test for human and animal parenteral drugs, biological products, and medical devices; 1987. pp. 1e54.
13. Martinho FC, Gomes BPFA. Quantification of endotoxins and cultivable bacteria in root canal infection before and after chemomechanical preparation with 2.5% sodium hypochlorite. *J Endod* 2008; 34:268-72.
14. Khabbaz MG, Anastasiadis PL, Sykaras SN. Determination of endotoxins in the vital pulp of human carious teeth: association with pulpal pain. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001;91:587-93.
15. 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;22:411-8.
16. Gomes BPFA, Martinho FC, Vianna ME. Comparison of 2.5% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine gel on oral bacterial lipopolysaccharide reduction from primarily infected root canals. *J Endod* 2009; 35: 1350-3.

17. Rocha RA, Silva RA, Assed S, et al. Nitric oxide detection in cell culture exposed to LPS after Er:YAG laser irradiation. *Int Endod J* 2009;2:992-6.
18. de Oliveira LD, Jorge AO, Carvalho CA, Koga-Ito CY, Valera MC. In vitro effects of endodontic irrigants on endotoxins in root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007;104:135-42.
19. Cardoso MG, de Oliveira LD, Koga-Ito CY, Jorge AO. Effectiveness of ozonated water on *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, and endotoxins in root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008;105:85-91.
20. Marinho ACS, Martinho FC, Zaia AA, Ferraz CCR, Gomes BPF. Influence of the apical enlargement size on the endotoxin level reduction of dental root canals. *J Appl Oral Sci* 2012;20: 661-6.
21. Martinho FC, Chiesa WM, Leite FR, Cirelli JA, Gomes BP. Antigenic activity of bacterial endodontic contents from primary root canal infection with periapical lesions against macrophage in the release of interleukin-1beta and tumor necrosis factor alpha. *J Endod* 2010; 36: 1467-74.
22. Martinho FC, Chiesa WMM, Marinho ACS, Zaia AA, Ferraz CCR, Almeida JFA 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; 36: 1766-9.
23. 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;37:163-7
24. Ding JL, Ho B. Endotoxin detection--from *Limulus Amebocyte Lysate* to recombinant factor C. *Subcell Biochem.* 2010;53:187-208.
25. de Jesus Soares A, Yuri Nagata J, Casarin RC, Flávio Affonso de Almeida J, Gomes BP, Augusto Zaia A, Randi Ferraz CC, José de Souza-Filho F. Apexification with a new intra-canal medicament: a multidisciplinary case report. *Iran Endod J* 2012;7:165-70.

26. Csako G, Elin RJ, Hochstein HD, Tsai CM. Physical and biological properties of U.S. standard endotoxin EC after exposure to ionizing radiation. *Infect Immun* 1983; 41:190-6.
27. Roslansky PF, Novitsky TJ. Sensitivity of Limulus Amebocyte Lysate (LAL) to LAL-reactive glucans. *J Clin Microbiol* 1991;29:2477-83.
28. Nagi N, Ohno N, Adachi Y, et al. Application of Limulus test (G pathway) for the detection of different conformers of (1>3)-beta-D-glucans. *Biol Pharm Bull* 1993;16:822-8.
29. Hochstein HD, Seligmann EB Jr, Marquina RE, Rivera E. Limulus Amebocyte Lysate testing of normal serum albumin (human) in the United States since 1975. *Dev Biol Stand.* 1979;44:35-42.
30. Cohen J, McConnell JS. Observations on the measurement and evaluation of endotoxemia by a quantitative limulus lysate microassay. *J Infect Dis* 1984;150:916-24.
31. Sturk A, Joop K, ten Cate JW, Thomas LL. Optimization of a chromogenic assay for endotoxin in blood. *Prog Clin Biol Res* 1985;189:117-37.
32. Oliveira LD, Carvalho CA, Carvalho AS, Alves JS, Valera MC, Jorge AO. Efficacy of endodontic treatment for endotoxin reduction in primarily infected root canals and evaluation of cytotoxic effects. *J Endod* 2012; 38:1053-7.
33. Silva LAB, Nelson Filho P, Leonardo MR, Rossi MA, Pansani CA. Effect of calcium hydroxide on bacterial endotoxin in vivo. *J Endod* 2002;28:94-8.
34. Sousa EL, Martinho FC, Nascimento GG, Leite FR, Gomes BP. Quantification of Endotoxins in Infected Root Canals and Acute Apical Abscess Exudates: Monitoring the Effectiveness of Root Canal Procedures in the Reduction of Endotoxins. *J Endod* 2014;40:177-81.
35. Oliveira LD, Leão MV, Carvalho CA, Camargo CH, Valera MC, Jorge AO, Unterkircher CS. In vitro effects of calcium hydroxide and polymyxin B on endotoxins in root canals. *J Dent* 2005;33:107-14.
36. Fujita Y, Nabetani T. Iron sulfate inhibits Limulus activity by induction of structural and qualitative changes in lipid A. *J Appl Microbiol* 2014;116:89-99.

TABLE1. Distribution of Endotoxin concentration (EU/mL) and performance characteristic of kinetic Turbidimetric LAL assay by the interaction with antimicrobial agents of endodontic therapy.

Sample number	Antimicrobial Substances	pH	Sample dilution	% Coefficient of variation	% PPC	Endotoxin levels (EU/mL)	Inhibition/Enhancement of endotoxin recovery
1	Pyrogen-free water (Negative control)	7	1:1	0.2	100%	1.0 (VR)	No interference
			1:10	0.1	100%	0.9 (VR)	No interference
			1:100	0.01	101%	0.9 (VR)	No interference
			1:1000	0.01	96%	1.0 (VR)	No interference
			1:10000	0.01	100%	1.0 (VR)	No interference
2	Hemorrhagic exudate (Positive control)	6.1	1:1	3.2	237%	14.02 (NVR)	Enhancement
			1:10	4.3	296%	9.2 (NVR)	Enhancement
			1:100	2.6	217%	9.6 (NVR)	Enhancement
			1:1000	4.3	242%	8.7 (NVR)	Enhancement
			1:10000	5.8	210%	9.0 (NVR)	Enhancement
3	5.25% NaOCl	11.5	1:1	1.3	174%	0.41 (VR)	No interference
			1:10	0.2	146%	0.42 (VR)	No interference
			1:100	0.1	158%	0.42 (VR)	No interference
			1:1000	0.4	120%	0.4 (VR)	No interference
			1:10000	0.1	100%	0.4 (VR)	No interference
4	2.5% NaOCl	11.2	1:1	2.1	120%	0.57 (VR)	No interference
			1:10	1.8	119%	0.52 (VR)	No interference
			1:100	1.5	108%	0.51 (VR)	No interference
			1:1000	1.2	105%	0.61 (VR)	No interference
			1:10000	0.2	89%	0.6 (VR)	No interference

5	2% CHX gel	6	1:1	2.6	109%	0.63 (VR)	No interference
			1:10	2.8	106%	<1.0 (VR)	No interference
			1:100	2.7	139%	0.65 (VR)	No interference
			1:1000	2.3	118%	0.67 (VR)	No interference
			1:10000	1.1	107%	0.64 (VR)	No interference
6	2% CHX solution	6.4	1:1	1.3	119%	0.63 (VR)	No interference
			1:10	2.1	131%	0.6 (VR)	No interference
			1:100	2.4	146%	0.67 (VR)	No interference
			1:1000	1.3	132%	0.63 (VR)	No interference
			1:10000	1.1	105%	0.63 (VR)	No interference
7	1% Natrosol gel	7.1	1:1	0.4	160%	0.75 (VR)	No interference
			1:10	1.3	155%	0.74 (VR)	No interference
			1:100	2.4	165%	0.71 (VR)	No interference
			1:1000	1.2	166%	0.72 (VR)	No interference
			1:10000	0.2	138%	0.72 (VR)	No interference
8	17% EDTA	6.4	1:1	1.2	116%	0.84 (VR)	No interference
			1:10	1.3	124%	0.89 (VR)	No interference
			1:100	0.7	133%	0.87 (VR)	No interference
			1:1000	0.4	101%	0.83 (VR)	No interference
			1:10000	1.1	98%	0.83 (VR)	No interference
9	10% Citric acid	2.5	1:1	5.3	128%	0.85 (VR)	No interference
			1:10	4.5	179%	0.81 (VR)	No interference
			1:100	2.8	114%	0.86 (VR)	No interference
			1:1000	2.3	118%	0.87 (VR)	No interference

			1:10000	1.6	192%	0.83 (VR)	No interference
10	3% Hydrogen peroxide	2.6	1:1	7.7	36%	< 0.01 (NVR)	Inhibition
			1:10	6.5	34%	0.0219 (NVR)	Inhibition
			1:100	8.6	24%	0.016 (NVR)	Inhibition
			1:1000	9.7	30%	0.081 (NVR)	Inhibition
			1:10000	4.9	31%	0.01 (NVR)	Inhibition
11	5% Sodium thiosulphate	6.8	1:1	2.5	164%	0.82 (VR)	No interference
			1:10	1.8	192%	0.83 (VR)	No interference
			1:100	2.4	115%	0.83 (VR)	No interference
			1:1000	1.3	164%	0.85 (VR)	No interference
			1:10000	0.2	110%	0.86 (VR)	No interference
12	0.5% Tween 80 associated with 0.07% soy lecithin	7.3	1:1	1.6	190%	0.91 (VR)	No interference
			1:10	1.8	148%	0.9 (VR)	No interference
			1:100	2.5	152%	0.9 (VR)	No interference
			1:1000	1.2	185%	0.92 (VR)	No interference
			1:10000	1.1	150%	0.91 (VR)	No interference
13	Otosporin®	5.4	1:1	5.7	14%	<0.01 (NVR)	Inhibition
			1:10	3.5	27%	0.014 (NVR)	Inhibition
			1:100	3.6	27%	0.03 (NVR)	Inhibition
			1:1000	3.3	26%	0.001 (NVR)	Inhibition
			1:10000	3.6	24%	0.001 (NVR)	Inhibition
14	Ca(OH) ₂	12.2	1:1	4.6	N/D	N/D	No reading
			1:10	5.1	392%	2.1 (NVR)	Enhancement

			1:100	4.4	353%	4.7 (NVR)	Enhancement
			1:1000	4.3	207%	3.6 (NVR)	Enhancement
			1:10000	0.2	120%	0.3 (VR)	No interference
15	Ca(OH) ₂ + 2% CHX gel	12.7	1:1	5.4	N/D	N/D	No reading
			1:10	4.3	459%	4.7 (NVR)	Enhancement
			1:100	2.2	376%	5.8 (NVR)	Enhancement
			1:1000	6.5	231%	7.9 (NVR)	Enhancement
			1:10000	1.0	81%	0.47 (VR)	No interference
16	Ca(OH) ₂ + 2% CHX gel + ZOE	12.4	1:1	4.2	N/D	N/D	Enhancement
			1:10	5.2	450%	8.33 (NVR)	Enhancement
			1:100	5.5	522%	5.26 (NVR)	Enhancement
			1:1000	3.3	492%	2.01 (NVR)	Enhancement
			1:10000	2.6	418%	2.34 (NVR)	Enhancement
17	Calen®	12.8	1:1	1.5	134%	0.31 (VR)	No interference
			1:10	1.4	126%	0.29 (VR)	No interference
			1:100	0.6	117%	0.29 (VR)	No interference
			1:1000	0.3	79%	0.32 (VR)	No interference
			1:10000	0.1	80%	0.31 (VR)	No interference
18	Triple antibiotic paste	14.7	1:1	5.3	N/D	N/D	Enhancement
			1:10	4.1	N/D	7.03 (NVR)	Enhancement
			1:100	4.6	588%	6.76 (NVR)	Enhancement
			1:1000	3.3	416%	6.41 (NVR)	Enhancement
			1:10000	2.9	418%	4.84 (NVR)	Enhancement

19	MTA	12.5	1:1	4.5	N/A	N/D	Enhancement
			1:10	3.1	377%	13.7 (NVR)	Enhancement
			1:100	2.2	279%	7.4 (NVR)	Enhancement
			1:1000	1.5	293%	6.9 (NVR)	Enhancement
			1:10000	0.9	178%	0.78 (VR)	No interference
20	Iodoform	7.3	1:1	1.1	74%	0.91 (VR)	No interference
			1:10	0.2	66%	0.91 (VR)	No interference
			1:100	1.3	78%	0.86 (VR)	No interference
			1:1000	1.8	73%	0.9 (VR)	No interference
			1:10000	2.6	71%	0.9 (VR)	No interference

VR, validate; NV, non-validate endotoxin recovery according to the inhibition/enhancement assay and performance characteristic (reproducibility assay).

2.2 Artigo 2- Proinflammatory activity of primarily infected endodontic content against macrophages after different phases of the root canal therapy

Artigo aceito para publicação no periódico Journal of Endodontics 2015 Jun;41(6):817-23.
doi: 10.1016/j.joen.2015.01.017.

Marinho AC, Martinho FC, Leite FR, Nascimento GG, Gomes BP.

ABSTRACT

Introduction: This study investigated the presence of target bacterial species and the levels of endotoxins in teeth with apical periodontitis. Levels of inflammatory mediators (interleukin [IL]-1 β and tumor necrosis factor [TNF]- α) were determined after macrophage stimulation with endodontic content after different phases of endodontic therapy using different irrigants. **Methods:** Thirty primarily infected root canals were randomly assigned into three groups according to the irrigant used for root canal preparation (n=10 per group): GI - 2.5% sodium hypochlorite (NaOCl); GII - 2% chlorhexidine (CHX) gel and GIII (control group) - saline solution (SS). Root canal samples were taken by using paper points before (s1) and after root canal instrumentation (s2), subsequently to 17% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (s3), after 30 days of intracanal medication [(Ca(OH)₂ + SS)] (s4) and before root canal obturation (s5). Polymerase chain reaction (16S rDNA) and Limulus Amebocyte Lysate assay were used for bacterial and endotoxin detection, respectively. Macrophages were stimulated with the root canal contents for IL-1 β /TNF- α measurement using enzyme-linked immunosorbent assay. **Results:** *Porphyromonas gingivalis* (17/30), *Porphyromonas endodontalis* (15/30) and

Prevotella nigrescens (11/30) were the most prevalent bacterial species. At s1, endotoxins were detected in 100% of the root canals (median 32.43 EU/mL). In parallel, substantial amounts of IL-1 β and TNF- α were produced by endodontic content-stimulated macrophages. At s2, a significant reduction in endotoxin levels was observed in all groups, with GI presenting the greatest reduction ($p < .05$). After root canal rinse with EDTA (s3), intracanal medication (s4) and before root canal obturation (s5) endotoxin levels reduced without differences between groups ($p < .05$). IL-1 β and TNF- α release decreased proportionally to the levels of residual endotoxin ($p < .05$). **Conclusion:** Regardless the use of NaOCl or CHX, the greatest endotoxin reduction occurs after chemomechanical preparation. Increasing steps of root canal therapy associated with intracanal medication enhances endotoxin reduction leading to a progressively lower activation of pro-inflammatory cells such as macrophages.

Key-words: Bacteria, cytokines, chlorhexidine, LPS, medication, NaOCl.

INTRODUCTION

Host response to Gram-negative anaerobic bacteria and their products such as lipopolysaccharides (LPS, endotoxin) is an important determinant for the onset and progression of endodontic disease (1-5). Among several host degradative pathways, considerable interest has been focused on cytokines not only as mediators of host defense against invasive bacteria but also as mediators of periapical tissues destruction (5-8).

Inflammatory cytokines produced by host cells of the immune lineage, e.g. monocytes/macrophages, represent a reflex of the root canal conditions and determine the local immune/inflammatory process within the periapical environment (9,10). Interleukin-1 (IL-1) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) have pleiotropic effects including activation of inflammatory leukocytes, modification of vascular permeability and induction of bone resorption (5,7,10-16).

Lipopolysaccharides are able to potently activate monocytes/macrophages causing rapid release of cytokines (6, 7). The mechanism whereby LPS triggers cytokine release occurs via its lipid A moiety, which is responsible for most of the LPS-induced biological responses (9). Recently, it was demonstrated that IL-1 β and TNF- α levels were increased in periapical tissues of teeth with higher levels of root canal LPS (5). Similarly, several investigators demonstrated that IL-1 β and TNF- α levels were increased in the periodontal tissues from diseased sites in association with higher levels of endotoxins (17,18). They also reported that total

amounts of these cytokines were markedly reduced following effective periodontal treatments, indicating their relevance to the severity of periodontal diseases.

To better predict the healing process of the periapical tissues, the removal of root canal bacteria and their byproducts remains the most effective approach for the endodontic disease (1,19-21). Nevertheless, even when treatment has followed proper standards, endotoxins can persist in root canal walls even after microorganisms are rendered nonviable (19-22).

In the light of current knowledge, little is known whether treated root canal content, whose residual endotoxin is still present, remains biologically active to elicit an immune response by triggering the production of inflammatory mediators. Hence, it would be of interest to determine the pro-inflammatory potential of endodontic content in different steps of endodontic therapy, including chemomechanical preparation, root canal medication up to root canal obturation by means of cytokine release.

Therefore, this study was conducted to investigate the levels of endotoxins in root canals of teeth with apical periodontitis and to determine the release of the pro-inflammatory mediators (interleukin [IL]-1 β and tumor necrosis factor [TNF]- α) by macrophages following stimulation with endodontic content after different phases of endodontic therapy using different irrigants.

MATERIAL AND METHODS

Patient Selection

Thirty patients needing endodontic treatment who attended the Piracicaba Dental School, Piracicaba, São Paulo, Brazil, were included in this study. The age of the patients ranged from 18 to 55 years. A detailed medical and dental history was obtained from each subject. Patients who had received antibiotic treatment during the previous 3 months or who had a general disease were excluded from the study. The selected teeth showed absence of periodontal pockets deeper than 4 mm. Their pulp chamber exhibited no visual communication with the oral fluid. The Human Research Ethics Committee of the Piracicaba Dental School approved a protocol describing the sample collection for this investigation and all patients signed an informed consent for their participation in this research.

All the selected teeth were single-rooted showing the presence of one root canal with pulp necrosis and radiographic evidence of apical periodontitis. None of the patients reported spontaneous pain.

Sampling Procedure

For degradation of preexisting endotoxins, all the materials used in the experiment were sterilized by gamma radiation with cobalt 60 (20 KGy for 6 hours) (23). The method used for disinfecting the operative field has been previously published (4, 5, 20). Initially, the teeth were isolated with a rubber dam. The crown

and surrounding structures were disinfected with 30% H₂O₂ (volume/volume [V/V]) for 30 seconds, followed by 2.5% sodium hypochlorite (NaOCl) for the same period of time and then inactivated with 5% sodium thiosulphate.

With regard to the access cavity preparation, a sterile/LPS-free high-speed diamond bur (KG-Sorensen, Barueri, SP, Brazil) was used in conjunction with manual irrigation with sterile saline. Before entering the pulp chamber, the access cavity was disinfected according to the protocol described above. A new sterile/LPS-free bur was used to access the canal.

Root canal length was determined by preoperative radiograph and then, the first endotoxin sampling was taken by introducing sterile/apyrogeic paper points (size #15; Dentsply-Maillefer, Balaigues, Switzerland) into the full length of the canal and retained in position during 60 seconds. Whenever it was not possible to place the paper point into the full length extension of the root canal, the tooth was excluded from the study. Immediately, the paper point was placed on a pyrogen-free glass and frozen at -80 °C for future Limulus amoebocyte lysate (LAL) assay and cell culture stimulation. In order to confirm the presence of gram-negative bacterial species and to support the presence of root canal endotoxins, the procedure was repeated with 3 sterile paper points that were pooled in a sterile tube containing 1 mL Viability Medium Goteborg Agar (VMGA) III transport medium being immediately processed for DNA extraction by molecular method (16S rDNA).

Before root canal preparation (s1), root canal length was confirmed by apex locator (Novapex; Forum Technologies, Rishon le-Zion, Israel) and the teeth were

randomly divided into 3 groups according to the irrigant used for root canal preparation: GI - 2.5% NaOCl (n=10); GII - 2% CHX gel (n=10), and GIII (control group) - saline solution (n=10).

The root canals were then prepared with Mtwo instruments (VDW, Munich, Germany) with permanent rotation at a speed of 300 rpm (4). Mtwo instruments (10/.04, 15/.05, 20/.06, 25/.06, 30/.05, 35/.04 and 40/.04) were used up to full length of the root canal using a single-length technique, with gentle in-and-out movements while gradually forcing apically (4). The use of each instrument was followed by the selected irrigant for each group.

In GI, root canal irrigation was performed with 5 mL of 2.5% NaOCl solution, simultaneously removed by suction. In GII, 1mL of 2% CHX gel was introduced into the root canal and, after the use of each instrument, 5 mL of sterile/LPS-free saline solution was used to wash the canal. In GIII, root canal irrigation was performed with 5 mL of saline solution, simultaneously removed by suction. All irrigation procedures were performed with a 5 mL syringe and a 27-gauge needle (Ultradent Products, South Jordan, UT, USA).

After root canal preparation (s2), NaOCl was inactivated with 5 mL of sterile 5% sodium thiosulphate for 1 minute, which was then removed with 5 mL of sterile/LPS-free saline solution. The chemical activity of CHX was inactivated with 5 mL of a solution containing 5% Tween 80 and 0.07% (v/v) lecithin for 1 minute, which was removed with 5 mL sterile/LPS-free saline solution.

After neutralization of the auxiliary chemical substances, the second sampling procedure was taken from the root canals as previously described. Removal of the smear layer was performed with 3 mL of 17% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) solution for 3 minutes, followed by a final flush with 5 mL of sterile/LPS-free saline solution (s3). Next, the third sampling procedures were taken.

Subsequently, the canals were filled with freshly prepared paste of Ca(OH)_2 in saline solution (1:1). The paste was inserted into the canals by using a sterile/LPS-free Lentulo bur (Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Switzerland). Special attention was paid to complete fill the root canal with the medication. A cotton pellet was used to condense the paste at the canal orifice level and a periapical radiography was performed to ensure the quality of the root canal filling. Next, the access cavities were sealed with light-cured resin composites (3M Dental Products, St Paul, MN, USA). After 30 days of intracanal medication (s4), the canals were aseptically accessed under rubber dam isolation according to the protocol for disinfection, as previously described. Ca(OH)_2 was removed with a K-file size 40, 0.02 taper against the lateral walls of the root canal and copious irrigation with 10 mL of saline solution. Then, sampling procedures were performed (s4).

Before root canal obturation, the final instrumentation was performed finishing with the use of three files larger than the last one used for apical preparation. This procedure was associated with the irrigation protocol for each

group. Immediately, root canals were rinsed with their respective neutralizer substances followed by a final irrigation with 5 mL of saline solution. Root canals were irrigated with 3 mL of 17% EDTA for 3 minutes, followed by a final flush with 10 mL of sterile/apyrogenic saline solution. Afterwards, the root canal was again similarly collected (s5).

Microbiological Assessment (PCR 16S rDNA)

Reference gram-negative bacteria strains used in this study were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC) and are listed as follows: *Prevotella intermedia* (ATCC 25611), *Prevotella nigrescens* (ATCC 33099), *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277), *Porphyromonas endodontalis* (ATCC 35406), *Prevotella tanneriae* (ATCC 51259), *Treponema denticola* (ATCC 35405) and *Treponema socranskii* (ATCC 35536). Bacterial selection criteria were performed based on the most commonly found species in primary root canal infection (2,4,5,25,26). Bacterial detection by polymerase chain reaction (PCR) was used to assure that the sampling technique was able to collect the endodontic microbiota for further cell stimulation.

DNA Extraction

Microbial DNA from endodontic samples as well as from ATCC bacteria were extracted and purified with the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. DNA concentration

(absorbance at 260 nm) was determined using a spectrophotometer (Nanodrop 2000, Thermo Scientific, Wilmington, DE).

PCR Assay

PCR (16 rDNA) reaction was performed in a thermocycler (My-Cycler; Bio-Rad, Hercules, CA) in a total volume of 25 μ L containing 2.5 μ L of 10X Taq buffer (1X) (MBI Fermentas, Mundolsheim, France), 0.5 μ L of dNTP mix (25 mmol/L of each deoxyribonucleoside triphosphate—dATP, dCTP, dGTP, and dTTP) (MBI Fermentas, Hanover, MD), 1.25 μ L of 25 mmol/L MgCl₂, 0.25 μ L of forward and reversal universal primers (0.2 mmol/L) (Invitrogen, Eugene, OR), 1.5 μ L of sample DNA (1 mg/50 mL), 1.5 μ L of Taq DNA polymerase (1 U) (MBI Fermentas), and 17.25 μ L of nuclease-free water. The primer sequences and PCR cycling parameters were previously optimized (18, 19) and listed in Table 1.

Quantification of Endotoxins

Turbidimetric test (BioWhittaker, Inc, Walkersville, MD) was used to measure endotoxin concentrations in the root canals using the Limulus Amebocyte Lysate (LAL) technique. First, as a parameter for the calculation of the amount of endotoxins in root canal samples, a standard curve was plotted using endotoxins supplied in the kit with a known concentration (100 EU/mL) and its dilutions with

the following final concentrations (ie, 0.01, 0.10, 1, and 10 EU/mL) according to the manufacturer's instructions.

Test Procedure

All reactions were accomplished in duplicate to validate the test. A 96-well microplate (Corning Costar, Cambridge, MA) was used in a heating block at 37°C and maintained at this temperature throughout the assay. First, the endotoxin samplings were suspended in 1 mL of LAL water supplied on the kit and agitated in vortex for 60 seconds and serial diluted to the 10^{-1} . Immediately, 100 μ L of the blank followed the standard endotoxin solutions in concentrations (ie, 0.01, 0.10, 1, and 10 EU/mL), and 100 μ L of the samples were added in duplicate in the 96-well microplate. The test procedure was performed following the manufacturer's instructions. The absorbance of endotoxin levels was measured individually using an enzyme-linked immunosorbent assay plate reader (Ultramark, Bio- Rad Laboratories, Inc) at 340 nm. Because the mean absorbance value of the standards was directly proportional to the concentration of endotoxins present, the endotoxin concentration was determined from the standard curve.

Cell culture

Macrophages (RAW 264.7) were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 100 IU/ml of penicillin, 100 μ g/ml of streptomycin, and 10 % fetal bovine serum (FBS) and maintained in a humidified

atmosphere at 37°C and 5 % CO₂ until confluence. Unless noted otherwise, all tissue culture reagents were obtained from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). A total of 10⁴ macrophages were grown for 48 h in each well of six-well plates, deinduced by incubation for 8 h in culture medium (DMEM) containing 0.3 % FBS, and stimulated with 60 µl of root canal contents of each phase of endodontic treatment. After 24 h supernatants were collected and stored at -80 °C in order to quantify the total amount of IL-1β and TNF-α protein released in the culture media.

Measurements of cytokine levels

Levels of IL-1β and TNF-α released to the culture media by endodontic content-stimulated macrophages were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA; DuoSet kit, R&D, Minneapolis, MN). Medium of unstimulated macrophage culture was used as a negative control. Briefly, standard, control, or sample solution were added to an ELISA well plate, which had been precoated with the specific monoclonal antibody for IL-1β or TNF-α, supplied by the manufacturer. After shaking for 3 h, polyclonal anti-IL-1β and anti-TNF-α antibody conjugated with horseradish peroxidase was added to the solution for 1 h. A substrate solution containing hydrogen peroxidase and chromogen was added and allowed to react. The levels of cytokines were assessed by an ELISA reader at 450 nm and normalized for the negative control values. Each densitometric value expressed as mean and standard deviation (SD) was obtained from three independent experiments.

Statistical analysis

Data were typed onto a spreadsheet and analyzed with the software STATA 12.0 (StataCorp., College Station, TX, USA). The Pearson chi-square test or the one-sided Fisher exact test, as appropriate, was chosen to test the null hypothesis that there was no relationship between bacteria species. All data were submitted to a descriptive analysis. After that, data were \log^{10} transformed, and those that presented normal distribution were analyzed through the one-way ANOVA post hoc Bonferroni for the inter-group analysis, and the paired t-test and repeated measures ANOVA for the intra-group analysis. Those that did not attend the normal distribution were analyzed with the correspondent non-parametric test Mann-Whitney post hoc Dunn for inter-group analysis, and matched Wilcoxon paired test for intra-group analysis. Additionally, linearity and association between endotoxin, IL-1 β and TNF- α levels at baseline were tested with the Pearson's correlation and simple linear regression, respectively. For all referred tests, the significance value was set at 5%.

RESULTS

Microbiological Assessment (PCR 16 rDNA)

Bacterial DNA was detected in all root canal samples at s1 (30/30). The maximum of five species was detected each root canal sample. At least one gram-negative species was detected in combination with other two or more gram-negative target species. *Porphyromonas gingivalis* (17/30), *Porphyromonas endodontalis* (15/30), *Prevotella nigrescens* (11/30) were the most frequently detected bacterial species.

Determination of Endotoxin Concentration

Individual mean and standard deviation (SD) of values of endotoxins found in root canals at the different sampling times are shown in Table 2. LAL assay indicated that endotoxin was present in 100% of the root canals (30/30) with a mean value of 32.43 EU/mL. After root canal instrumentation (s2), significant reduction of endotoxin levels was observed in all groups compared with the baseline samples ($p < .05$). Higher endotoxin reduction was achieved by 2.5% NaOCl group (GI) when compared to either 2% chlorhexidine gel (GII) or control (GIII) ($p < .05$). Root canal rinse with 17% EDTA for 3 minutes improved endotoxin reduction (GII, $p < .05$). After 17% EDTA no differences were found between groups.

Intracanal medication for 30 days (s4) was able to significantly reduce endotoxins left by chemomechanical preparation ($p < .05$). Comparing the results

from before root canal obturation with those obtained after intracanal medication, minimal amounts of endotoxins were recovered ($p < .05$). At s5, no significant differences were found in the endotoxin reduction when comparing 2.5% NaOCl and 2% CHX groups. Saline solution achieved the lowest effectiveness for endotoxin removal from the root canals (Table 2).

Figure 1 provides an overview of endotoxin reduction achieved after each step of the endodontic therapy.

Measurements of IL-1 β and TNF- α Levels

IL-1 β and TNF- α were detected in all culture media after stimulation with root canal contents. ELISA assays showed that mean values of TNF- α (960.94 pg/mL) were present in almost 25-fold higher than IL-1 β (37.69 pg/mL) (Table 2). A positive correlation between IL-1 β and TNF- α was found ($r = 0.67$, $p < 0.001$). In addition, a linear regression analysis was able to show a positive association among these cytokines ($\beta = 7.79$; $R^2 = 0.47$; $P < 0.001$).

Higher production of IL-1 β and TNF- α was observed in initial samples compared with those found after root canal preparation (s2) ($p < .05$). Lower mean production of IL-1 β and TNF- α was detected in 2.5% NaOCl and 2% CHX groups compared to saline control ($p < .05$). Root canal rinse with 17% EDTA (s3) contributed for the reduction in IL-1 β and TNF- α levels in the control and in GI.

Intracanal medication with calcium hydroxide (s4) resulted in a significant reduction of IL-1 β and TNF- α in all groups indistinctively as well as for the re-

instrumentation performed before root canal obturation (s5). No differences were found between 2.5% NaOCl and 2% CHX ($p > .05$). However, higher levels of IL1- β and TNF- α were found when macrophages were stimulated with root canal contents treated only with saline solution when compared to GI and GII, as shown in Figure 2.

DISCUSSION

The present study demonstrated the biologic activity repertoire of root canal contents after different phases of endodontic therapy by the production of inflammatory mediators. Most *in vitro* studies focused on the immunostimulatory effect of isolated LPS on macrophages cytokine release. Considering the structural heterogeneity of LPSs when present in a microbial community and their consequent functional activity, we attempted to stimulate macrophage cells with clinical samples obtained from infected endodontic content (1, 2, 6, 24).

The PCR primer analysis detected the presence of target gram-negative bacterial species in 100% of the root canals at the initial samples (s1). This data is important to show the presence of a complex microbiota and to elucidate the role played by these species in endodontic disease, thus supporting the presence of endotoxins in such infected root canals. Our results demonstrated that *P. gingivalis*, *P. endodontalis* and *P. nigrescens* were the most frequently detected species in accordance with previous findings (5, 25, 26). The maximum of five species were detected in the root canal samples with at least 1 gram-negative

species detected in all root canals. A combination of two or more species was found in 27 of 30 root canals investigated.

Experimental evidence indicates that bacterial species in co-cultures can increase the pathogenicity of the infectious flora, which leads to a stronger immune response in periapical tissues (25). In addition, the gram-negative bacterial species found in root canals indicate that different bacterial LPS with different toxicity structure (lipid A) are involved in apical periodontitis (27). The corresponding interactions with host-derived cells are key factors influencing the strength of the inflammatory host response to the lipid A when it activates the toll-like receptor (TLR)-4 (28, 29).

Monitoring the endotoxins levels during all root canal phases

In the last decades it has been shown that the amount and activity of endotoxins in root canal correlate with the number of gram-negative bacteria (30). It is also known that these endotoxins play an important role in the development of periapical lesions (30).

The considerable difficulty in removing endotoxins from infected root canals (4) and their stimulatory effects on monocytes/macrophages (15, 16, 29) reaffirm the relevance of this molecule as a marker of performance for clinical trials.

In the present study, endotoxins were recovered from all the root canals investigated at the initial sampling (s1) with a mean value of 32.4 EU/mL, agreeing with previous studies (4,5,18-20, 22). A significant mean percentage value of endotoxin reduction was achieved in all groups after chemomechanical preparation

(s2), emphasizing the importance of mechanical removal by instrumentation and the flow and backflow of the root canal irrigants (3, 4, 20- 22).

Sodium hypochlorite and chlorhexidine are the most commonly used auxiliary chemical substances in endodontic therapy (3,4,20-22). The individual analysis of the experimental groups demonstrated the best results of 2.5% NaOCl when compared to 2% CHX gel regarding endotoxin reduction after chemomechanical preparation (s2), agreeing with the findings of Gomes et al (21). However, neither 2.5% NaOCl nor 2% CHX gel totally eliminated LPS in any of the teeth evaluated, suggesting their low efficacy against oral bacterial LPS in clinical practice without the aid of mechanical action.

Regardless of the auxiliary chemical substance, it is necessary to remove both the organic and inorganic remnants by the use of chelating agents (ie, ethylenediaminetetraacetic acid [EDTA]) (31). In addition, Leive (32) showed that EDTA was able to release LPS from live whole bacteria walls and internal components (32). Due to its properties, we hypothesized that EDTA might contribute for the endotoxin removal from root canal walls during endodontic treatment.

After root canal rinse with 17% EDTA (s3) for a 3-minute period, a decrease of endotoxin levels was observed. Despite reduction, endotoxin was still not totally eliminated. Noteworthy, the endotoxin threshold levels capable to compromise the healing process of periapical tissues are still unknown and must be individually host-dependent (3-4, 20, 26).

The use of calcium hydroxide as intracanal medication seems to clinically benefit the removal of endotoxin from root canals (22, 24). Due to its very alkaline pH of 10–12, LPS treatment with this alkali leads to release of hydroxy fatty acids from the lipid A moiety, as a result of LPS breakdown (33). The slightest variation of the fatty acid chains of the bioactive molecule of lipid A renders the entire molecule biologically inactive (28, 33). This potential mechanism by which $\text{Ca}(\text{OH})_2$ degrades LPS could contribute for decreasing the immunostimulatory effect of the endodontic content during root canal treatment. One of the main reasons to use an interappointment dressing is to allow time for the medication to diffuse and reach bacteria and LPS in those areas inaccessible to chemomechanical preparation (1, 22). Due to this fact, calcium hydroxide medication ability in neutralizing endotoxins was tested when used for 30 days.

Our results demonstrated the ability of calcium hydroxide medication to significantly reduce post-instrumented levels of endotoxin from infected root canals (s4) agreeing with the findings of Sousa et al (24). Detoxification of residual LPS in the root canal by calcium hydroxide treatment may be one of the mechanisms by which this agent exerts its beneficial effects in clinical endodontics.

After intracanal medication removal, prior to the root canal filling, a final root canal preparation together with EDTA flush enhanced the endotoxin removal with no significant differences between the tested groups.

Of great clinical importance, our results showed that mechanical action of the endodontic instruments associated to the physical action of the irrigation

significantly reduced the levels of root canal endotoxins. Indeed, each subsequent endodontic procedure reflected in an improvement of LPS reduction left by the previous step, and therefore, a low recovery of LPS in the end of endodontic therapy, regardless of the irrigant used.

Monitoring the cytokine levels during all root canal phases

ELISA assays showed that the initial endodontic content (s1) strongly stimulated the production of IL-1 β and TNF- α , which is consistent with the findings of Martinho et al (5) and Oliveira et al (22). Both cytokines were detected in a 100% of the culture media in response to pre-treated root canals contents. A positive correlation was found between them, agreeing with previous studies (5, 13-16). It seems reasonable to assume that these cytokines may operate in concert for the exacerbation of inflammation in a positive feedback (13-16). IL-1 and TNF- α have been shown to play a pivotal role in several chronic diseases, and are known to be strong stimulators of osteoclastic bone resorption (5, 10, 11, 13- 15). The anti-IL-1 β antisera, in animal model, were able to significantly neutralize bone resorption activity in periapical lesions (13).

In the present study, high levels of TNF- α were a hallmark in all cases investigated, indicating that macrophages have greater sensitivity to microbial irritants regarding TNF- α release. Indeed, TNF- α was one of the first bone resorptive mediators identified in human periapical lesions, being its involvement in

the progression of periapical lesions demonstrated in a cause-effect relationship (16). Analysis of the biologic activity of root canal content showed that samples collected after root canal preparation (s2) promoted a lower production of IL-1 β and TNF- α than those collected before treatment.

Root canal irrigation with EDTA (s3) was able to decrease the release of IL1- β and TNF- α in macrophages supernatants. These outcomes reinforce the contribution of 17% EDTA (3 ml for 3 minutes/every minute renewal of the solution) for endotoxin/biologic activity reduction of the root canal content, being therefore, an important step of the chemo-mechanical preparation.

Likewise, intracanal medication resulted in a significant reduction of IL1- β and TNF- α in all groups. It is also likely that the reduction of cytokines at subsequent appointments would be partly due to a decrease in the microorganisms present in the root canal system.

Similarly, lower levels of IL1- β and TNF- α were detected at the end of endodontic therapy, prior to root canal filling (s5), with no differences between the experimental groups. However, root canal irrigation with saline solution failed to reduce the endotoxin levels and also the biologic activity of endodontic content when compared to the experimental groups. Overall, the effectiveness of the irrigation protocol for root canal preparation seems to be determinant for bacterial and endotoxin reduction, cytokine release and further healing process onset.

In conclusion, our findings demonstrated that the infectious endodontic content exerted high capacity of stimulating macrophages through the levels of IL-

1 β and TNF- α Regardless the use of NaOCl or CHX, the greatest endotoxin reduction occurs after chemomechanical preparation. Increasing steps of root canal therapy associated with intracanal medication enhances endotoxin reduction leading to a progressively lower activation of pro-inflammatory cells such as macrophages.

REFERENCES

1. Siqueira JF Jr, Rôças IN, Ricucci D, Hülsmann M. Causes and management of post-treatment apical periodontitis. *Br Dent J* 2014;216:305-12.
2. Montagner F, Castilho Jacinto R, Correa Signoretti FG, Scheffer de Mattos V, Grecca FS, Gomes BP. Beta-lactamic resistance profiles in *Porphyromonas*, *Prevotella*, and *Parvimonas* species isolated from acute endodontic infections. *J Endod* 2014;40:339-44.
3. Marinho ACS, Martinho FC, Zaia AA, Ferraz CCR, Gomes BPF. Influence of the apical enlargement size on the endotoxin level reduction of dental root canals. *J Appl Oral Sci* 2012;20:661-6.
4. Martinho FC, Chiesa WMM, Marinho ACS, Zaia AA, Ferraz CCR, Almeida JFA 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;36: 1766-9.
5. Martinho FC, Chiesa WM, Leite FR, Cirelli JA, Gomes BP. Antigenic activity of bacterial endodontic contents from primary root canal infection with periapical lesions against macrophage in the release of interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α . *J Endod* 2010;36:1467-74.

6. Hong CY, Lin SK, Kok SH, Cheng SL, Lee MS, Wang TM, Chen CS, Lin LD, Wang JS. The role of lipopolysaccharide in infectious bone resorption of periapical lesion. *J Oral Pathol Med* 2004;33:162-9.
7. Horiba N, Maekawa Y, Abe Y, Ito M, Matsumoto T, Nakamura H. Correlations between endotoxin and clinical symptoms or radiolucent areas in infected root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1991;71:492-5.
8. Liu SM, King C. IL-21-producing Th cells in immunity and autoimmunity. *J Immunol* 2013;191:3501-6.
9. Lim GC, Torabinejad M, Kettering J, et al. Interleukin 1- β in symptomatic and asymptomatic human periradicular lesions. *J Endod* 1994;20:225-7.
10. Matsuo T, Ebisu S, Shimabukuro Y, et al. Quantitative analysis of immunocompetent cells in human periapical lesions: correlations with clinical findings of the involved teeth. *J Endod* 1992;18:497-500.
11. Artese L, Piattelli A, Quaranta M, et al. Immunoreactivity for interleukin 1-beta and tumor necrosis factor-alpha and ultrastructural features of monocytes/macrophages in periapical granulomas. *J Endod* 1991;17:483-7.
12. Darveau RP. Oral innate host defense responses: interactions with microbial communities and their role in the development of disease. In: Kuramitsu HK, Ellen R, eds. *Oral bacterial ecology: the molecular basis*. Norfolk: Horizon Scientific Press; 2000;169-218.
13. Barkhordar RA, Hussain MZ, Hayashi C. Detection of interleukin-1 β in human periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1992;73:334-6.
14. Safavi KE, Rossomando EF. Tumor necrosis factor identified in periapical tissue exudates of teeth with apical periodontitis. *J Endod* 1991;17:12-4.
15. Garlet GP. Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a reappraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. *J Dent Res* 2010;89:1349-63.
16. Graves DT, Oates T, Garlet GP. Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions. *J Oral Microbiol* 2011;17:3.

17. Tsai CC, Ho YP, Chen CC. Levels of interleukin-1 beta and interleukin-8 in gingival crevicular fluids in adult periodontitis. *J Periodontol* 1995;66:852-9.
18. Stashenko P, Jandinski JJ, Fujiyoshi P, Rynar J, Socransky SS. Tissue levels of bone resorptive cytokines in periodontal disease. *J Periodontol*. 1991;62:504-9.
19. Schein B, Schilder H. Endotoxin content in endodontically involved teeth. *J Endod* 1975;1:19-21.
20. Gomes BP, Endo MS, Martinho FC. Comparison of endotoxin levels found in primary and secondary endodontic infections. *J Endod* 2012;38:1082-6.
21. Gomes BPFA, Martinho FC, Vianna ME. Comparison of 2.5% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine gel on oral bacterial lipopolysaccharide reduction from primarily infected root canals. *J Endod* 2009;35:1350-3.
22. Oliveira LD, Carvalho CA, Carvalho AS, Alves JS, Valera MC, Jorge AO. Efficacy of endodontic treatment for endotoxin reduction in primarily infected root canals and evaluation of cytotoxic effects. *J Endod* 2012;38:1053-7.
23. Csako G, Elin RJ, Hochstein HD, Tsai CM. Physical and biological properties of U.S. standard endotoxin EC after exposure to ionizing radiation. *Infect Immun* 1983;41:190-6.
24. Sousa EL, Martinho FC, Nascimento GG, Leite FR, Gomes BP. Quantification of endotoxins in infected root canals and acute apical abscess exudates: monitoring the effectiveness of root canal procedures in the reduction of endotoxins. *J Endod* 2014;40:177-81.
25. Gomes BP, Montagner F, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ. Polymerase chain reaction of *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia* in primary endodontic infections. *J Endod* 2007;33:1049-52.
26. 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;22:411-8.

27. Dixon DR, Darveau RP. Lipopolysaccharide heterogeneity: innate host responses to bacterial modification of lipid a structure. *J Dent Res* 2005;84:584-95.
28. Jain S, Darveau RP. Contribution of Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide to periodontitis. *Periodontol* 2010;54:53-70.
29. Rietschel ET, Brade H. Bacterial endotoxins. *Sci Am* 1992;267:54-61.
30. Dahlén G, Bergenholtz G. Endotoxic activity in teeth with necrotic pulps. *J Dent Res* 1980;59:1033-40.
31. Ozdemir HO, Buzoglu HD, Calt S, Cehreli ZC, Varol E, Temel A. Chemical and ultramorphologic effects of ethylenediaminetetraacetic acid and sodium hypochlorite in young and old root canal dentin. *J Endod* 2012;38:204-8.
32. Leive L. The barrier function of the gram-negative envelope. *Ann N Y Acad Sci* 1974;235:109-29.
33. Safavi KE, Nichols FC. Effect of calcium hydroxide on bacterial lipopolysaccharide. *J Endod* 1993;19:76-8.

TABLE 1. Polymerase Chain Reaction primer pairs and cycling parameters used for bacterial detection in primarily infected root canals with apical periodontitis

Target bacteria	Primer pairs (5'- 3')	Amplicon Size	Cycles
<i>Porphyromonas endodontalis</i>	Forward: GCT GCA GCT CAA CTG TAG TC Reverse: CCG CTT CAT GTC ACC ATG TC	672 bp	Initial denaturation at 95°C for 2 min and 36 cycles of 94°C for 30 s, 58°C for 1 min, 72°C for 2 min, and a final step 72°C for 10 min
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Forward: AGG CAG CTT GCC ATA CTG CG Reverse: ACT GTT AGC AAC TAC CGA TGT	404 bp	Initial denaturation at 95°C for 2 min and 36 cycles of 94°C for 30 s, 60°C for 1 min, 72°C for 2 min, and a final step 72°C for 2 min
<i>Prevotella intermedia</i>	Forward: TTT GTT GGG GAG TAA AGC GGG Reverse: TCA ACA TCT CTG TAT CCT GCG T	575 bp	Initial denaturation at 95°C for 2 min and 36 cycles of 94°C for 30 s, 58°C for 1 min, 72°C for 2 min, and a final step 72°C for 10 min
<i>Prevotella nigrescens</i>	Forward: ATG AAA CAA AGG TTT TCC GGT AAG Reverse: CCC ACG TCT CTG TGG GCT GCG A	804 bp	Initial denaturation at 95°C for 2 min and 36 cycles of 94°C for 30 s, 58°C for 1 min, 72°C for 2 min, and a final step 72°C for 10 min
<i>Prevotella tanneriae</i>	Forward: CTT AGC TTG CTA AGT ATG CCG Reverse: CAG CTG ACT TAT ACT CCC G	550 bp	Initial denaturation at 95°C for 2 min and 36 cycles of 94°C for 30 s, 55°C for 1 min, 72°C for 2 min, and a final step 72°C for 10 min
<i>Treponema denticola</i>	Forward: TAA TAC CGA ATG TGC TCA TTT ACA T Reverse: TCA AAG AAG CAT TCC CTC TTC TTC TTA	316 bp	Initial denaturation at 95°C for 2 min and 36 cycles of 94°C for 30 s, 60°C for 1 min, 72°C for 2 min, and a final step 72°C for 10 min
<i>Treponema socranskii</i>	Forward: GAT CAC TGT ATA CGG AAG GTA GAC A Reverse: TAC ACT TAT TCC TCG GAC AG	288 bp	Initial denaturation at 95°C for 2 min and 36 cycles of 94°C for 30 s, 56°C for 1 min, 72°C for 2 min, and a final step 72°C for 10 min

TABLE 2. Mean and standard deviation (SD) of endotoxin values (EU/mL) found in root canals and cytokines levels (pg/mL) in macrophage culture supernatants after stimulation with root canal content at the different sampling times.

Endotoxin	S1	S2	S3	S4	S5
GI	35.2 (24.20) ^{Aa}	0.09 (0.08) ^{Ab}	0.09 (0.07) ^{Ab}	0.01 (0.006) ^{Ac}	0.003 (0.002) ^{Ad}
GII	26.37 (25.12) ^{Aa}	0.81 (0.54) ^{Bb}	0.47 (0.56) ^{Ac}	0.11 (0.21) ^{Bc}	0.006 (0.004) ^{Ad}
GIII	35.72 (52.85) ^{Aa}	4.21 (12.72) ^{Cb}	1.77 (5.28) ^{Ab}	0.11 (0.29) ^{Bc}	0.02 (0.03) ^{Be}
IL-1β					
GI	33.18 (8.44) ^{Aa}	8.54 (2.27) ^{Ab}	8.04 (2.29) ^{Ab}	5.99 (1.73) ^{Ac}	2.50 (1.57) ^{Ad}
GII	39.31 (11.39) ^{Aa}	6.52 (2.84) ^{Ab}	5.65 (3.01) ^{Ab}	4.43 (2.55) ^{Ac}	2.55 (1.92) ^{Ad}
GIII	43.70 (20.59) ^{Aa}	27.96 (8.79) ^{Bb}	22.14 (7.95) ^{Bc}	17.02 (7.94) ^{Bd}	7.44 (1.60) ^{Be}
TNF-α					
GI	983.94 (61.32) ^{Aa}	405.19 (36.67) ^{Ab}	392.04 (26.05) ^{Ac}	86.39 (51.13) ^{Ad}	27.96 (18.85) ^{Ae}
GII	965.06 (52.88) ^{Aa}	470.93 (95.91) ^{Ab}	456.94 (75.95) ^{Ab}	95.63 (55.09) ^{Ac}	37.57 (20.89) ^{Ad}
GIII	933.80 (82.92) ^{Aa}	543.75 (95.53) ^{Bb}	590.91 (90.92) ^{Bb}	193.50 (158.37) ^{Bc}	98.34 (44.90) ^{Bd}

s1- before root canal instrumentation; s2- after root canal instrumentation; s3- after 17% EDTA rinse; s4- after 30 days of intracanal medication s5- before root canal obturation; GI - 2.5% sodium hypochlorite; GII - 2% chlorhexidine gel; GIII - saline solution.

Uppercase letters indicate statistical differences at intergroup level (column) and lowercase letters indicate statistical differences at intragroup level (row) considering $p < .05$

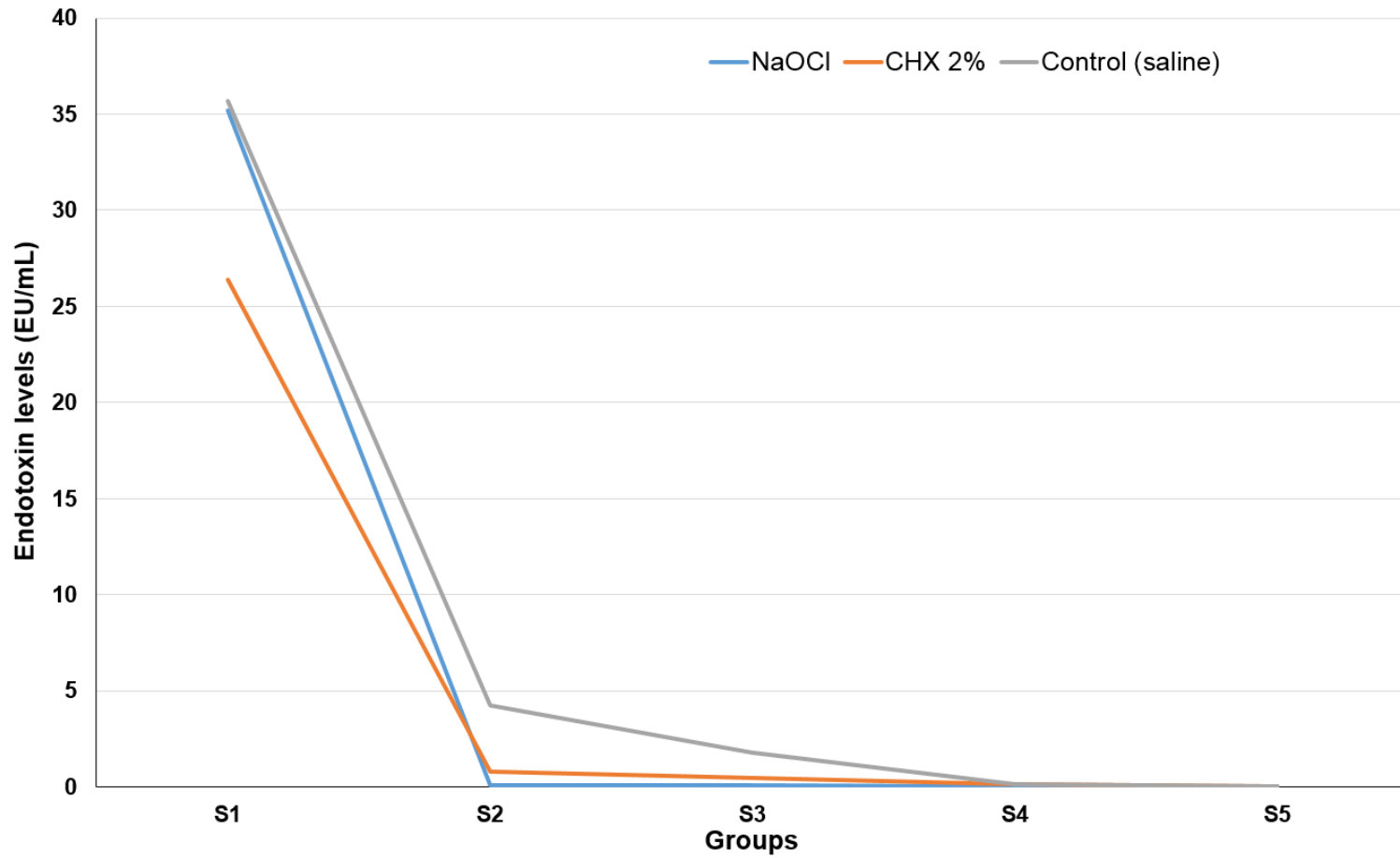


FIGURE 1. Overview of endotoxin reduction achieved by the use of different irrigants and intracanal medication during endodontic therapy.

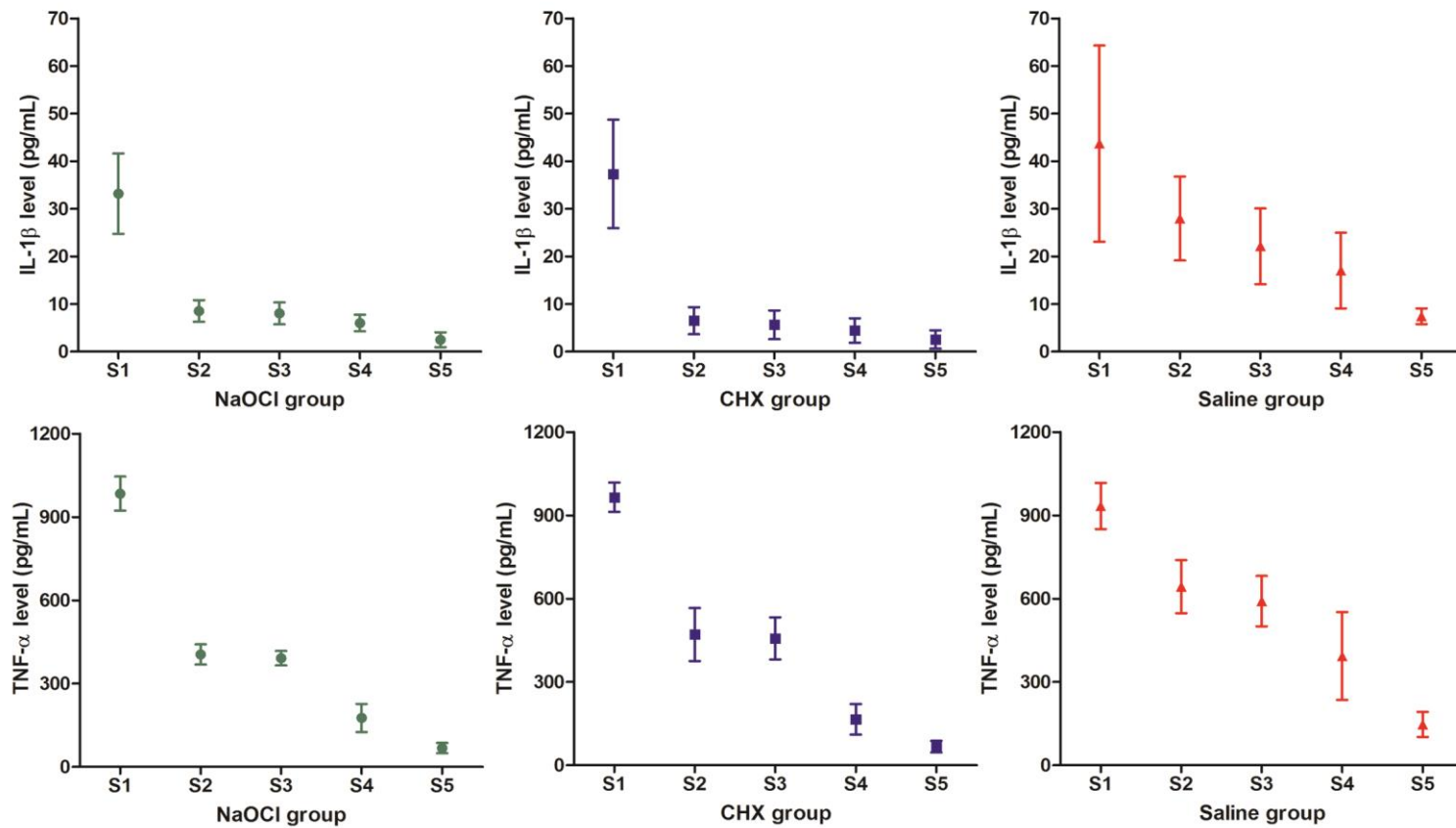


FIGURE 2. Cytokine production in macrophage culture supernatants after stimulation with root canal contents at different sampling times.

2.3 Artigo 3- Does the Reciproc file remove root canal bacteria and endotoxins as effectively as multife rotary systems?

Artigo aceito para publicação no periódico International Endodontic Journal. 2015 Jun; 48(6):542-8. doi: 10.1111/iej.12346

Marinho AC, Martinho FC, Gonçalves LM, Rabang HR, Gomes BP.

ABSTRACT

Introduction: To evaluate the effectiveness of Reciproc for the removal of cultivable bacteria and endotoxins from root canals in comparison with multife rotary systems. **Methodos:** The root canals of forty human single-rooted mandibular premolars were contaminated with an *Escherichia coli* suspension for 21 days and randomly assigned to four groups according to the instrumentation system: GI – Reciproc (VDW, Munich, Germany); GII – Mtwo (VDW, Munich, Germany); GIII – ProTaper Universal (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Switzerland); and GIV –FKG RaceTM (FKG Dentaire, Lachaux-de-Fonds, Switzerland) (n=10 per group). Bacterial and endotoxin samples were taken with a sterile/apyrogenic paper point before (s1) and after instrumentation (s2). Culture techniques determined the colony-forming units (CFU) and the Limulus Amebocyte Lysate assay was used for endotoxin quantification. Results were submitted to paired *t*-test and ANOVA. **Results:** At s1, bacteria and endotoxins were recovered in 100% of the root canals investigated (40/40). After instrumentation, all systems were associated with a highly significant reduction of the bacterial load and endotoxin levels, respectively: GI - Reciproc (99.34% and 91.69%); GII - Mtwo (99.86% and

83.11%); GIII- ProTaper (99.93% and 78.56%); and GIV- FKG Race™ (99.99% and 82.52%) ($p < 0.001$). No statistical difference were found among the instrumentation systems regarding bacteria and endotoxin removal ($p > 0.01$).

Conclusion The reciprocating single-file, Reciproc, was as effective as the multifile rotary systems for the removal of bacteria and endotoxins from root canals.

Key-words: Bacterial reduction, disinfection, endodontic treatment, endotoxins, reciprocating motion, rotary instruments.

INTRODUCTION

Bacteria and their byproducts are considered to be the major cause of pulpal and periapical disease (Takehashi *et al.* 1965). Different bacterial species are able to colonize the root canal system, however, Gram-negative bacteria are predominant in primary endodontic infection (Gomes *et al.* 2012).

Lipopolysaccharide (LPS), known as endotoxin, is the main constituent of the outer membrane of Gram-negative bacteria being released during multiplication or bacterial death. Previous examinations have revealed that whole bacteria or their respective LPSs yield similar host responses (Darveau *et al.* 1991, Somerville *et al.* 1996). Hence, host response to endotoxins can contribute significantly to the overall innate response to bacterial infection (Darveau *et al.* 1991). Recent clinical studies have demonstrated a key role played by LPS in triggering inflammation and subsequent release of inflammatory mediators (Oliveira *et al.* 2012, Huang *et al.*

2013). One impact of these mediators is a damaging effect on periapical tissues, resulting in bone resorption evidenced radiographically as a periapical lesion (Nair 2004).

It is well known that endotoxins are present in 100% of primarily infected root canals, with higher levels related to the presence of clinical and radiographic features of periapical disease (Jacinto *et al.* 2005, Vianna *et al.* 2007, Gomes *et al.* 2009, Martinho *et al.* 2010, Marinho *et al.* 2012). To better predict the healing process of periapical tissues, the removal of bacteria and their byproducts, such as endotoxins, remains the most effective approach (Schein & Schilder 2006, Siqueira *et al.* 2013). Mechanical removal by instrumentation together with the flow and backflow of root canal irrigants is of paramount importance for the proper management of the endodontic infection, once this combination can drastically reduce root canal contaminants (Gomes *et al.* 2012, Siqueira *et al.* 2013).

In modern endodontic practice, engine-driven rotary instrumentation with nickel-titanium (NiTi) rotary files have been increasingly used for root canal preparation since it reduces procedural errors, preparation time and operator fatigue in comparison with manual instrumentation (Foschi *et al.* 2004, Machado *et al.* 2010). Previous studies demonstrated that root canal preparation with multifile rotary systems is able to achieve a reduction of more than 90% of bacteria and endotoxin load from infected root canals (Martinho *et al.* 2010, Marinho *et al.* 2012). Despite this pronounced reduction, rotary systems involve a large number of files when the full-sequence is used, have several steps, a risk of fracture and

thus, still require an extended canal preparation time and a greater learning curve to achieve competence.

The Reciproc system (VDW, Munich, Germany) is designed to completely prepare and clean the root canals with only one instrument (Siqueira *et al.* 2013, Machado *et al.* 2013). Currently, Reciproc files are available in three sizes 25, .08 taper; 40, .06 taper and 50, .05 taper that should be selected according to the initial canal diameter.

Attempts has been made to evaluate the efficacy of Reciproc instruments in preserving the original geometry of root canals (Chen *et al.* 2013), shaping canals (Yoo & Cho 2012, Bürklein *et al.* 2013), reducing extruded apical debris (Koçak *et al.* 2013), and also removing filling material (Schäfer *et al.* 2013, Zuolo *et al.* 2013). However, the mechanical efficacy of root canal preparation when using a single-file for the removal of bacteria and endotoxins remains questionable. Several studies have investigated the effectiveness of Reciproc instruments in reducing root canal bacteria, but none have evaluated their ability to reduce endotoxins.

Therefore, the aim of this study was to evaluate the effectiveness of Reciproc for the removal of cultivable bacteria and endotoxins from root canals in comparison with multfiles rotary systems. The null hypothesis tested was that there are no differences in the bacterial and endotoxin reduction promoted by Reciproc file and rotary systems.

MATERIALS AND METHODS

Specimen preparation

The study was approved by the Ethics Committee of Research of the Piracicaba Dental School, State University of Campinas, UNICAMP (Protocol n°186/09). Forty freshly extracted human mandibular premolars were used. The teeth were collected from a general dental practice and had been extracted for pulpal or periodontal reasons. The teeth were stored in a 0.9% saline solution until use. Specimen selection was made on the basis of relative dimensions and similarity in root morphology. In order to be included, the teeth had to have a mature root apex with no evidence of external resorption and a single narrow straight root canal. Preoperative radiographs were taken to ensure that the teeth did not have root caries, fractures, multiple canals, lateral canals, calcifications or curvatures. None of the teeth had received prior root canal treatment. Debris, calculus, and soft tissue remnants on the root surfaces were removed using periodontal curettes (Golgran- Millennium, São Paulo, SP, Brazil). The crowns were sectioned transversely at the level of the cementum-enamel junction using a water-cooled diamond disk (KG Sorensen, Barueri, SP, Brazil). The root length was standardized to 15 mm. Apical patency was determined by inserting a size 10 K-file (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Switzerland) into the root canal until the tip was visible at the apical foramen. Only narrow canals with the initial apical diameter no longer than a size 15 K-file (Dentsply Maillefer) were included. All teeth were placed in an ultrasonic bath for 10 min in 17% EDTA, followed by 10

min in 5.25% NaOCl, according to Ferraz *et al.* (2001) in order to open dentinal tubules. Afterwards, root canals were rinsed with a phosphate buffered saline solution followed by distilled water to eliminate EDTA and sodium hypochlorite residues (10 min each). For degradation of preexisting endotoxins, all teeth were submitted to gamut radiation with cobalt 60 (20 KGy for 6 h) (Csako *et al.* 1983) and then, individually placed in bottles containing 5.0 mL of Brain Heart Infusion Broth (BHI; Oxoid, Basingstoke, UK) and autoclaved at 121°C, 1 atm, for 15 min. Then, the teeth were kept at 37 °C incubator for 24 h to check the efficacy of the sterilization treatment. No microbial growth was observed for each specimen tested, confirming the sterility of the root canals.

Specimen contamination

Isolated colonies (24 h) of pure cultures of *Escherichia coli* (ATCC 25922) grown on 5% defibrinated sheep blood + Brain Heart Infusion agar plates were suspended in 5.0 mL of BHI broth. The cell suspension was adjusted spectrophotometrically to match the turbidity of 1.5×10^8 colony forming unit (CFU mL)¹ (equivalent to ± 0.5 McFarland standard).

The bottles containing each specimen were opened under laminar flow. Sterile pipettes were used to remove 2.0 mL of sterile BHI and to replace it with 2.0 mL of the bacterial inoculum. The bottles were closed and kept at 37°C for 21 days, with the replacement of 1.0 mL of contaminated BHI for 1.0 mL of freshly prepared BHI every 2 days, to avoid medium saturation. The turbidity of the medium during the incubation period indicated bacterial growth. The purity of the

cultures was confirmed by Gram staining, catalase production, colony morphology on BHI agar + blood. This was also confirmed by Polymerase Chain Reaction (PCR 16S rDNA). The protocol of contamination and bacterial penetration into the dentinal tubules was confirmed by scanning electron microscopy evaluation in a pilot study.

Following the contamination period, each specimen was removed from its bottle under aseptic conditions and mounted in a sterile aluminium apparatus. Before instrumentation (s1), the canals was irrigated with 1 mL of sterile/apyrogenic saline solution and the first bacterial sample was taken by introducing a sterile/apyrogenic size15 paper point (Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Switzerland) into the full length of the canal and left there for 1 minute. The bacterial samples were placed individually in a 1.5 mL eppendorff tubes containing 1 mL BHI. Afterwards, the first endotoxin sample was carried out similarly and placed in an apyrogenic glass with 1 mL endotoxin-free water (LAL water, LONZA, Walkersville, MD, USA) for further quantification of endotoxins.

Instrumentation procedures

The specimens were randomly assigned to four groups according to the instrumentation system used for root canal preparation as follows:

- **GI.** Reciproc R25 (tip size 25, 0.08 taper) (VDW, Munich, Germany) (n=10) - The file was gently inserted into the cervical third with an in-and-out pecking motion with low amplitude. After 3 in-and-out movements, when more

pressure was needed to make the instrument advance further in the canal, the file was removed to clean the flutes. The canal was then copiously irrigated with 5 mL of LAL water. After, the file was reused in the same manner along the middle third followed by irrigation. Lastly, the file was inserted up to the full extension of the root canal with a brushing motion against the lateral walls of the root canal and a final flush with 10 mL of LAL water was performed.

- **GII.** Mtwo (VDW, Munich, Germany) (n=10) - All Mtwo instruments were used to the full length of the canals (single-length technique) according to the manufacturer's instructions using a gentle in-and-out motion. Brushing action was performed against the walls. The sequence of the files was size 10, 0.04 taper; size 15, 0.05 taper; size 20, 0.06 taper, and size 25, 0.06 taper. The use of each instrument was followed by irrigation of the root canal with 5 mL of LAL water.
- **GIII.** ProTaper Universal (Dentsply Maillefer) (n=10) - ProTaper instruments were used in a crown-down manner according to the manufacturer's instructions using a gentle in-and-out motion. The instrumentation sequence was: SX instrument at two-third of working length (WL); S1 and S2 instruments at 1mm short of the WL, F1 and F2 instruments at WL. The files were passively used in a back and forth movements and also in a laterally brushing motion to provide more contact against the walls up to the

full extension of the root canal. During instrumentation with ProTaper instruments, 4 mL of LAL water was used after each instrument.

- **GIV.** FKG Race™ (FKG Dentaire, Lachaux-deFonds, Switzerland) (n=10) - The root canals were prepared in a crown-down manner according to the manufacturer's instructions. The sequence used was size 40, 0.10 taper then, size 30, 0.06 taper in the middle third and size 25, 0.04 taper in the apical third with a short and rapid light pressure in back and forth movements. The use of each instrument was followed by irrigation with 5 mL of LAL water.

All instruments were used with a 6:1 contra-angle handpiece (Sirona, Bensheim, Germany) powered by a torque-limited electric motor (VDW Silver Reciproc). For the Mtwo, ProTaper and Race files, the individual torque limits and rotational speeds programmed in the library of the motor were used, while the Reciproc instruments were used in a reciprocating working motion generated by the motor.

For each experimental group, once the instrument had achieved the end of the canal and rotated freely, it was removed. Each instrument was used to prepare only one root canal. In each group, two non-contaminated root canals were instrumented and used as negative controls. Due to the different number of files in the groups, a total volume of 20 mL of LAL water per canal was then standardized. All irrigation procedures were performed with a 5 mL syringe and a 27-gauge

needle (Ultradent Products, South Jordan, UT, USA) which was inserted into the root canal without binding, through an in-and-out motion for better flow.

After chemomechanical preparation (s2), samples were also taken from the root canals, as previously described, in order to quantify the bacterial load and endotoxin levels.

Quantification of bacterial load and endotoxin levels

The eppendorff tubes containing the bacterial samples were vortexed for 1 minute and diluted with BHI broth by 10-fold serial dilution to 10^{-4} . A volume of 50 μ L of each dilution was inoculated in BHI agar + 5% of sheep defibrinated blood plates, which after 48 h incubation at 37°C, were subject to bacterial count.

For the quantitative assay of endotoxins, the Turbidimetric test (Pyrogen 5000[®], BioWhittaker, Inc, Walkersville, MD, USA) was performed using the LAL technique. The sample was mixed with the reconstituted LAL reagent, placed in a photometer, and automatically monitored over time until turbidity appeared. The time required before the appearance of turbidity (reaction time) is inversely proportional to the amount of endotoxin. As a parameter for calculation of the endotoxin levels present in the root canal samples, a standard curve was plotted by using a known endotoxin concentration supplied by the kit (100 EU/mL), with its dilutions reaching the final concentrations (0.01, 0.1, 1, 10 EU/mL) according to the manufacturer's instructions. To avoid inhibition or enhancement of LAL, a known concentration of *Escherichia coli* endotoxin was added to the clinical samples, as

recommended by the manufacturer (spike procedure). Both unspiked and spiked samples (control) had their endotoxin concentrations automatically calculated. The endotoxins recovered were equal to the known spike concentration, ranging from 50% to 200%. All reactions were performed in duplicate to validate the test. A 96-well microplate (Corning Costar, Cambridge, MA, USA) was placed on a heating block at 37°C and maintained at this temperature throughout the assay. Firstly, the endotoxin samples were suspended in 1 mL of LAL water supplied by the kit and agitated in vortex for 1 minute. Immediately afterwards, 100 μ L of the blank, followed by the same volume of the standard endotoxin solutions (0.01, 0.1, 1, 10 EU/mL) and 100 μ L of the samples, were added in duplicate to the 96-well microplate with their respectively positive controls. The test procedure was performed according to the manufacturer's instructions. The absorbance of endotoxins was measured individually using an enzyme-linked immunosorbent assay plate reader (Ultramark; Bio-Rad Laboratories, Inc, Hercules, CA, USA). During calculation of the endotoxin concentration, the microplate reader with WinKQCL Software (BioWittaker, Cambrex Co, Walkersville, MD, USA) monitored the absorbance of each microplate well continuously at 340 nm throughout the assay. The WinKQCL Software automatically performs a log/log linear correlation of the reaction time of each standard curve with its corresponding endotoxin concentration, including printing of the standard curve parameters. If the absolute value of the correlation coefficient (r) is 0.980, a polynomial model can be used to

construct a standard curve to predict, in turn, the endotoxin concentrations of the test samples.

Statistical analysis

Data were analyzed statistically using SAS/LAB software (SAS Software, version 9.0; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) with the significance level of 5%. Assumptions of the equality of variances and the normal distribution of errors were checked. Data were transformed by Log10 as suggested by the software. The paired *t*-test was used for intragroup analysis, and one-way ANOVA was used for intergroup analysis.

RESULTS

Sterility of the specimens was confirmed by the negative control group having no microbial growth and absence of endotoxins. For validation of the LAL test, the standard curve fulfilled the criteria of linearity for all assays, as reported by the guidelines. The culture technique and LAL assay indicated that both bacteria and endotoxins were present in 100% of the root canals investigated (40/40). After root canal instrumentation (s2), all systems were associated with a highly significant reduction in bacterial load and endotoxin levels ($p < 0.01$). Table 1 provides an overview of the individual mean values of bacteria and endotoxin load at the sampling times. No differences were found amongst the instrumentation systems regarding bacteria and endotoxin reduction ($p > 0.01$). The percentage

values of bacteria and endotoxin reduction are shown in Figure 1 and Figure 2 respectively.

DISCUSSION

The present study evaluated the effectiveness of Reciproc instrument in comparison with well-known multifile rotary systems to remove bacteria and endotoxins from root canals.

The data indicated that Reciproc files exhibited similar results when compared to the Mtwo, ProTaper and RaceTM instruments for bacterial and endotoxin removal. Thus, the null hypothesis tested was accepted.

At baseline, bacteria were recovered from 100% of the root canals sampled, validating the contamination protocol. Although *E. coli* is not commonly found in root canals with necrotic pulps, its endotoxin has the basic structure of the lipid-A component, which represents the bio-active centre responsible for the toxicity of LPS. Given the high LPS toxicity of *E. coli*, studies have suggested its use to evaluate either the effectiveness of different instrumentations protocols or the chemical effects of irrigants and intracanal medicaments on endotoxin (Oliveira *et al.* 2005, Oliveira *et al.* 2007, Marinho *et al.* 2012).

All systems were associated with a reduction of more than 99% of the root canal bacterial load, agreeing with the findings of Machado *et al.* (2013) and Alves *et al.* (2012). The Reciproc system achieved a considerable bacteria reduction of 99.34%. Because no auxiliary chemical substance was used, the bacteria

reduction depended only on the mechanical action of the instruments and irrigation with LAL water (endotoxin-free water).

All systems reduced endotoxin load to a similar level, which was between 78.55- 91.69%. Interestingly, these findings support the efficacy of root canal preparation with a single-file for the removal of endotoxins. Therefore, it seems reasonable to assume that the mechanical action of endodontic instruments on dentine together with copious irrigation is more relevant for endotoxin removal than the number of files presented by an instrumentation system.

No instrumentation system rendered root canals free of bacteria or endotoxins. Thus, root canal disinfection should not be focused only on a mechanical approach or on the choice of the instrument sequence, but on the persistence of bacteria and their byproducts out of reach of instruments and irrigating solutions due to the complexity of the root canal system. This fact reaffirms that mechanical preparation alone is not enough to eradicate bacteria and their endotoxins and that is necessary to combine it with the use of an auxiliary chemical substance (either NaOCl or CHX-gel) to achieve an effective disinfection protocol.

CONCLUSION

The reciprocating single-file, Reciproc, was as effective as the multife rotary systems for bacterial and endotoxin removal from the root canals.

REFERENCES

1. Alves FR, Rôças IN, Almeida BM, Neves MA, Zoffoli J, Siqueira JF Jr. Quantitative molecular and culture analyses of bacterial elimination in oval-shaped root canals by a single-file instrumentation technique. *International Endodontic Journal* 2012;45: 871-7.
2. Bürklein S, Benten S, Schäfer E. Shaping ability of different single-file systems in severely curved root canals of extracted teeth. *International Endodontic Journal* 2013;46: 590-7.
3. Chen F, Qiao JY, Li XF. Clinical evaluation on the preparation of cured root canals with Reciproc and Pathfile rotary instruments. *Shanghai Journal of Stomatology* 2013; 22: 338-41.
4. Csako G, Elin RJ, Hochstein HD, Tsai CM. Physical and biological properties of U.S standard endotoxin EC after exposure to ionizing radiation. *Infection and Immunity* 1983;41: 190-6.
5. Darveau RP, MD Cunningham, CL Seacchord, L Cassiano-Clough, WL Cosand, J Blake; CS Watkins. Beta- Lactam antibiotics potentiate magainin 2 antimicrobial activity in vitro and in vivo. *Antimicrobial Agents and Chemoterapy* 1991; 35: 1153-9.
6. Ferraz CC, Gomes BP, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. *In vitro* assessment of the antimicrobial action and mechanical ability of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant. *Journal of Endodontics* 2001;27: 452-5.
7. Foschi F, Nucci C, Montebugnoli L, Marchionni S, Breschi L, Malagnino VA, et al. SEM evaluation of canal wall dentine following use of Mtwo and ProTaper NiTi rotary instruments. *International Endodontic Journal* 2004;37: 832-9.
8. Gomes BP, Endo MS, Martinho FC. Comparison of endotoxin levels found in primary and secondary endodontic infections. *Journal of Endodontics* 2012;38: 1082-6.
9. Gomes BPF, Martinho FC, Vianna ME. Comparison of 2.5% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine gel on oral bacterial lipopolysaccharide

reduction from primarily infected root canals. *Journal of Endodontics* 2009;35: 1350-3.

10. Huang W, Zhao L, Jia Y, Chen JJ, Wu YF. Effect of Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide on the expression of CC chemokine receptor 2 in monocytes. *Chinese Journal of Stomatology* 2013;48: 393-7.

11. Jacinto RC, Gomes BPFA, Shah HN, Ferraz CC, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Quantification of endotoxins in necrotic root canals from symptomatic and asymptomatic teeth. *Journal of Medical Microbiology* 2005;54: 777-83.

12. Kakehashi S, Stanley H, Fitzgerald R. The effect of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology* 1965;20: 340-9.

13. Koçak S, Koçak MM, Sağlam BC, Türker SA, Sağsen B, Er Ö. Apical extrusion of debris using self-adjusting file, reciprocating single-file, and 2 rotary instrumentation systems. *Journal of Endodontics* 2013;39: 1278-80.

14. Machado ME, Nabeshima CK, Leonardo MF, Reis FA, Britto ML, Cai S. Influence of reciprocating single-file and rotary instrumentation on bacterial reduction on infected root canals. *International Endodontic Journal* 2013;46: 1083-7.

15. Machado ME, Sapia LA, Cai S, Martins GH, Nabeshima CK. Comparison of two rotary systems in root canal preparation regarding disinfection. *Journal of Endodontics* 2010;36: 1238-40.

16. Marinho ACS, Martinho FC, Zaia AA, Ferraz CCR, Gomes BPFA. Influence of the apical enlargement size on the endotoxin level reduction of dental root canals. *Journal of Applied Oral Science* 2012;20: 661-6.

17. Martinho FC, Chiesa WMM, Marinho ACS, Zaia AA, Ferraz CCR, Almeida JFA, Souza-Filho, FJ, et al. Clinical investigation of the efficacy of chemomechanical preparation with rotary nickel-titanium files for removal of endotoxin from primarily infected root canals. *Journal of Endodontics* 2010;36: 1766-9.

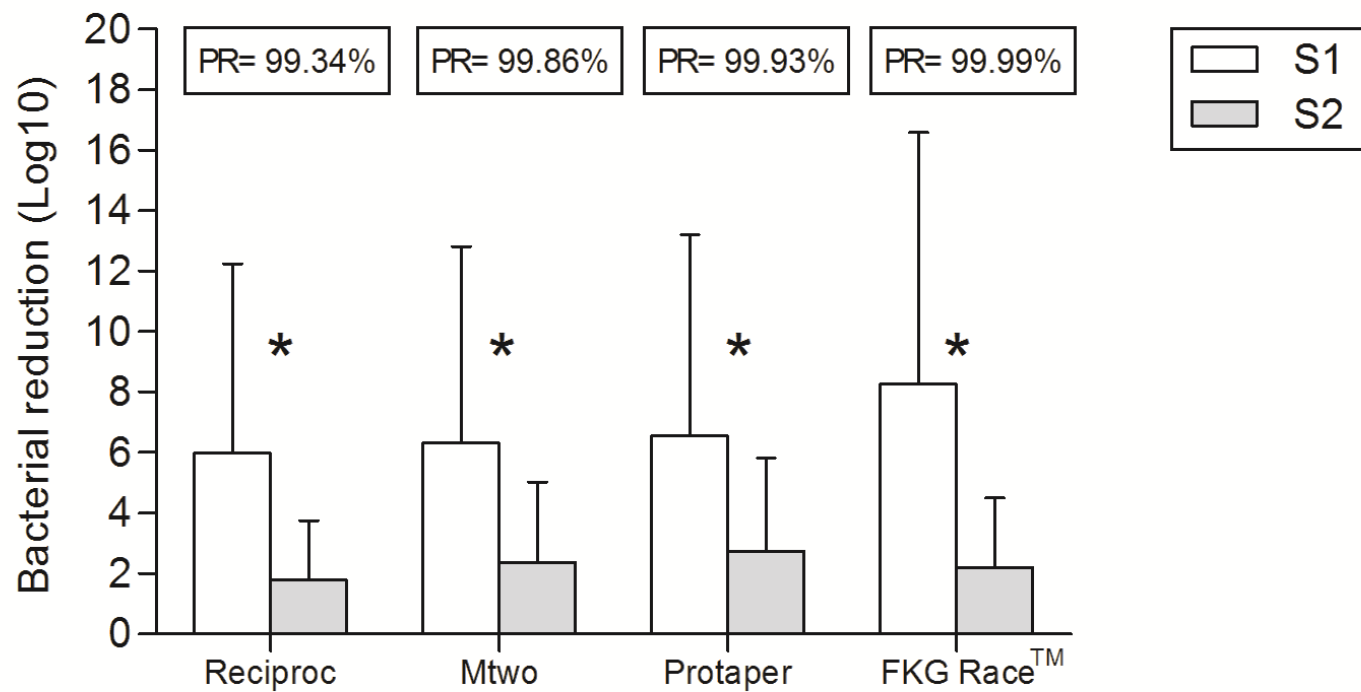
18. Nair PNR. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Critical Review of Oral Medicine* 2004;15: 348-81.
19. Oliveira LD, Carvalho CA, Carvalho AS, Alves JS, Valera MC, Jorge AO. Efficacy of endodontic treatment for endotoxin reduction in primarily infected root canals and evaluation of cytotoxic effects. *Journal of Endodontics* 2012;38: 1053-7.
20. Oliveira LD, Carvalho CA, Valera MC, Koga-Ito CY, Jorge AO. Diffusion ability of endotoxin through dentinal tubules. *Brazilian Oral Research* 2005;19: 5-10.
21. Oliveira LD, Jorge AOC, Carvalho CAT, Koga-Ito CY, Valera MC. In vitro effects of endodontics irrigants on endotoxins in root canals. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology Endodontics* 2007;104: 135-42.
22. Schäfer E, Köster M, Bürklein S. Percentage of gutta-percha-filled areas in canals instrumented with nickel-titanium systems and obturated with matching single cones. *Journal of Endodontics* 2013;39: 924-8.
23. Schein B, Schilder H. Endotoxin content in endodontically involved teeth. *Journal of Endodontics* 2006; 32: 293-95.
24. Siqueira JF Jr, Alves FR, Versiani MA, Rôças IN, Almeida BM, Neves MA, Sousa-Neto MD. Correlative bacteriologic and micro-computed tomographic analysis of mandibular molar mesial canals prepared by self-adjusting file, reciproc, and twisted file systems. *Journal of Endodontics* 2013; 39:1044-50.
25. Somerville JE, JL Cassiano, B Bainbridge, MD Cunningham, R.P Darveau. A novel *Escherichia Coli* lipid a mutant that produces an inflammatory lipopolysaccharide. *Journal of Clinical Investigation* 1996;97: 359-65.
26. Vianna ME, Horz HP, Conrads G, Zaia AA, Souza-Filho FJ, Gomes BP. Effect of root canal procedures on endotoxins and endodontic pathogens. *Oral Microbiology and Immunology* 2007;22: 411-8.
27. Yoo YS, Cho YB. A comparison of the shaping ability of reciprocating NiTi instruments in simulated curved canals. *Restorative Dentistry & Endodontics* 2012;37: 220-7.

28. Zuolo AS, Mello JE Jr, Cunha RS, Zuolo ML, Bueno CE. Efficacy of reciprocating and rotary techniques for removing filling material during root canal retreatment. *International Endodontic Journal* 2013;46: 947-53.

Table 1. Individual mean values (Log10) of bacteria and endotoxin content found in each group before (s1) and after instrumentation (S2).

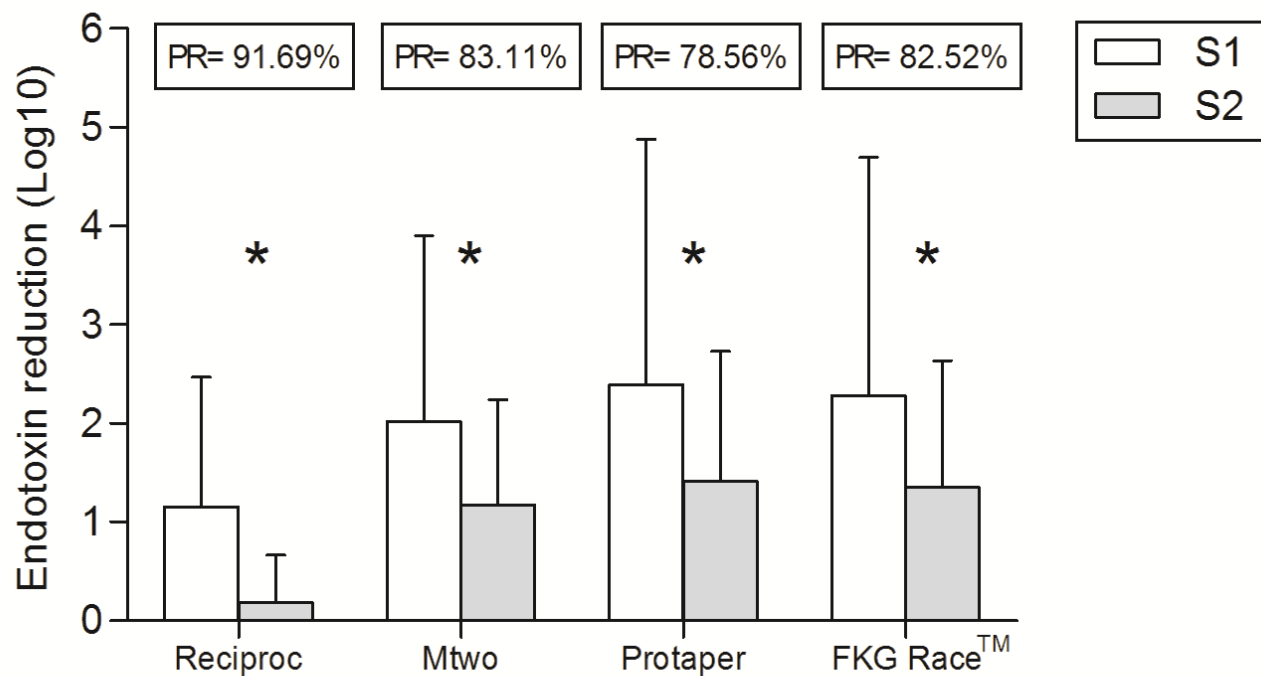
Groups	Bacteria		Endotoxin	
	Before (s1)	After (s2)*	Before (s1)	After (s2)*
Reciproc	5.98 ± 6.26 a	1.80 ± 1.95 b	1.16 ± 1.31 a	0.19 ± 0.48 b
Mtwo	6.32 ± 6.49 a	2.38 ± 2.64 b	2.02 ± 1.88 a	1.18 ± 1.06 b
Protaper	6.55 ± 6.65 a	2.74 ± 3.09 b	2.39 ± 2.49 a	1.42 ± 1.31 b
FKG Race	8.26 ± 8.33 a	2.20 ± 2.31 b	2.28 ± 2.42 a	1.35 ± 1.29 b

Different letters indicate significant statistical differences between initial and final sampling (Paired *t*-test, $P < 0.01$). Symbol (*) indicates that there were no significant differences between groups regarding bacterial and endotoxin reduction (ANOVA test, $P < 0.05$).



Symbol (*) indicates significant statistical differences between initial and final samplings (Paired t-test, $P < 0.01$). There were no significant differences among techniques tested regarding percentage bacterial reduction (PR) (ANOVA test, $P < 0.05$).

Figure 1. Distribution of the mean percentage values of bacteria reduction in each group after root canal instrumentation (s2).



Symbol (*) indicates significant statistical differences between initial and final samplings (Paired t-test, $P < 0.01$). There were no significant differences among techniques tested regarding percentage endotoxin reduction (PR) (ANOVA test, $P < 0.05$).

Figure 2. Distribution of the mean percentage values of endotoxin reduction achieved by the systems tested after root canal instrumentation (s2).

2.4 Artigo 4- Monitoring the effectiveness of root canal procedures on endotoxin levels found in teeth with chronic apical periodontitis

Artigo aceito para publicação no periódico Journal of Applied Oral Sciences 2014 Nov-Dec;22(6):490-5 doi: 10.1590/1678-775720130664.

Marinho AC, Martinho FC, Zaia AA, Ferraz CC, Gomes BP.

ABSTRACT

Objective: The aim of this study was to monitor the effectiveness of root canal procedures by using different irrigants and intracanal medication on endotoxin levels found in root canals of teeth with chronic apical periodontitis. **Material and methods:** Thirty root canals of teeth with pulpal necrosis associated with periapical lesions were selected and randomly divided into groups according to the irrigants used: GI - 2.5% NaOCl; GII - 2% chlorhexidine (CHX) gel, and GIII - saline solution (SS) (all, n=10). Samples were collected with sterile/apyrogenic paper points before (s1) and after root canal instrumentation (s2), after use of 17% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (s3), and after 30 days of intracanal medication (Ca(OH)₂+SS) (s4). A turbidimetric kinetic Limulus Amebocyte Lysate assay was used for endotoxin measurement. **Results:** Endotoxins were detected in 100% of the root canals investigated (30/30), with a median value of 18.70 EU/mL. After s2, significant median percentage reduction was observed in all groups, irrespective of the irrigant tested: 2.5% NaOCl (99.65%) (GI), 2% CHX (94.27%) (GII), and SS (96.79%) (GIII) (all p<.05). Root canal rinse with 17% EDTA (s3) for a 3-minutes period failed to decrease endotoxin levels in GI and a slight decrease was observed in GII (59%) and GIII (61.1%) (all p>.05). Intracanal medication for 30 days was able to significantly reduce residual endotoxins: 2.5% NaOCl (90%) (GI), 2% CHX (88.8%) (GII), and SS (85.7%) (GIII, p<.05). No differences were found in the endotoxin reduction when comparing s2 and s4 treatment groups. **Conclusion:** Our findings demonstrated the effectiveness of the mechanical action of the instruments together with the flow and back-flow of an

irrigant enduring root canal instrumentation for the endotoxin removal from root canals of teeth with chronic apical periodontitis. Moreover, the use of intracanal medication for 30 days contributed for an improvement of endotoxin reduction.

Keywords: Endotoxins. EDTA. Chlorhexidine. Sodium hypochlorite. Root canal. Medications.

INTRODUCTION

Lipopolysaccharides (LPSs), also known as endotoxins, present on the outer layers of the membrane from Gram-negative bacterial species have been detected in 100% of the root canals with endodontic infection, with higher levels related to the severity of bone destruction in periapical tissues as well as to the development of clinical features of the endodontic disease^{5-9,13-14,21,25}.

It has long been known that endotoxins found in pulp spaces and periapical areas are highly immunostimulatory, even at low concentrations^{2,5}. This molecule is recognized by the human host as a foreign³, eliciting a potent immune response that results in the release of different pro-inflammatory cytokines commonly involved in the pathogenesis of the apical periodontitis⁹⁻¹¹. In the light of this antigenic activity, detoxifying endotoxins from root canals during endodontic treatment may facilitate the healing process of the periapical tissues^{9,11-13}.

Considering that necrotic teeth associated with periapical lesions contain an increased amount of endotoxins^{2,22}, there is a great effort in the search for effective clinical procedures for their removal.

Clinical studies have demonstrated that chemomechanical preparation (CMP) using hand K-files for apical preparation 1 mm from the radiographic apex together with either sodium hypochlorite (NaOCl) or chlorhexidine (CHX) used as auxiliary chemical substance, has little or no effect on LPSs present in root canals^{6,12,14}, thus contributing to a reduction of only 50% of the LPS load. Conversely, root canal preparation with rotary instruments in the full extension of

the root canal was capable to achieve a removal of 90% of the LPSs contents^{11,13,25}. However, this virulence factor can still be detected in 100% of the root canal samples after instrumentation.

Because of the detoxifying activity of calcium hydroxide [Ca(OH)₂], its use as intracanal medication in infected root canals has been investigated^{12-13,16-21,23-26,28}. Vianna, et al.²⁹ (2007) reported that root canal dressing for 7 days contributes to a reduction of endotoxin in only 1.4% compared to the reduction observed after root canal instrumentation. Furthermore, the application of Ca(OH)₂ for 14 days contributed to improve the removal of endotoxins by 12%³⁰. This finding suggests that an extend period of intracanal medication could contribute to a better removal of endotoxins from infected root canals. Recently, Sousa, et al.²⁵ (2014) have demonstrated that Ca(OH)₂+2% CHX gel as root canal medicament for a 30-day period was able to significantly reduce endotoxins from root canals associated with acute apical abscesses. However, there is no current published clinical study monitoring the effectiveness of root canal procedures, involving both chemomechanical preparation with different auxiliary chemical substances, and the use of Ca(OH)₂ as root canal medication for an extended period of 30 days, aiming to the reduction of endotoxins from root canals of teeth with chronic apical periodontitis.

Therefore, this study was conducted to monitor the effectiveness of root canal procedures by using different irrigants and intracanal medication on endotoxin removal from root canals of teeth with chronic apical periodontitis.

MATERIAL AND METHODS

Patient selection

Thirty patients who attended the Piracicaba Dental School (SP, Brazil) for primary endodontic treatment were included in this study. A detailed dental history was obtained from each patient. Patients who had received antibiotic treatment

during the previous 3 months or who had a general disease were excluded from the study. The selected teeth showed absence of periodontal pockets deeper than 4 mm. Their pulp chamber exhibited no visual communication with the oral fluid. The Human Research Ethics Committee of the Piracicaba Dental School approved a protocol describing the sample collection for this investigation, and all patients signed an informed consent for their participation in this research.

All the selected teeth were single-rooted showing the presence of one root canal with pulp necrosis and radiographic evidence of apical periodontitis. A radiolucent area >4 mm was present in 11/30 patients. None of the patients reported spontaneous pain.

Sampling procedure

For degradation of preexisting endotoxins, all the materials used in the experiment were sterilized by gamma radiation with cobalt 60 (20 KGy for 6 hours)⁴. The method used for disinfecting the operative field has been previously published^{5-6,9,13,14}. Initially, the teeth were isolated with a rubber dam. The crown and surrounding structures were disinfected with 30% H₂O₂ (volume/volume [V/V]) for 30 seconds, followed by 2.5% NaOCl for the same period of time and then inactivated with 5% sodium thiosulphate.

With regard to the access cavity preparation, a sterile/apyrogeic high-speed diamond bur (KG-Sorensen, Barueri, SP, Brazil) was used in conjunction with manual irrigation with sterile saline. Before entering the pulp chamber, the access cavity was disinfected according to the protocol described above. A new sterile/apyrogeic bur was used to access the canal.

Root canal length was determined by preoperative radiograph and then, the first endotoxin sample (s1) was taken by introducing a sterile/apyrogeic paper point #15 (Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Switzerland) into the full length of the canal and left there for 1 minute. Then, the sample was placed in an apyrogeic

glass and immediately suspended in 1 mL Limulus Amebocyte Lysate (LAL) water for further quantification of endotoxins.

After the first endotoxin sampling (s1), root canal length was confirmed by apex locator (Novapex; Forum Technologies, Rishon le-Zion, Israel) and the teeth were randomly divided into 3 groups according to the irrigant used for CMP: GI - 2.5% NaOCl (n=10); GII - 2% CHX gel (n=10), and GIII - saline solution (n=10).

The root canals were then prepared with Mtwo instruments (VDW, Munich, Germany) with permanent rotation at a speed of 300 rpm¹³. Mtwo instruments (10/.04, 15/.05, 20/.06, 25/.06, 30/.05, 35/.04 and 40/.04) were used up to full length of the root canal using a single-length technique, with gentle in-and-out movements while gradually forcing apically¹³. The use of each instrument was followed by the selected irrigant used for CMP.

In GI, root canal irrigation was performed with 5 mL of 2.5% NaOCl solution, simultaneously removed by suction. In GII, 1 mL of 2% CHX gel was introduced into the root canal with a 3 mL syringe and a 27-gauge needle (Ultradent Products, South Jordan, UT, USA) and, immediately after the use of each instrument, 5 mL of sterile/apyrogeic saline solution was used to wash the canal. In GIII, root canal irrigation was performed with 5 mL of saline solution, simultaneously removed by suction. All irrigation procedures were performed with a 27-gauge needle.

After root canal preparation, NaOCl was inactivated with 5 mL of sterile 5% sodium thiosulphate for 1 minute, which then was removed with 5 mL of sterile/apyrogeic saline solution. The chemical activity of CHX was inactivated with 5 mL of a solution containing 5% Tween 80 and 0.07% (v/v) lecithin for 1 minute, which was then removed with 5 mL sterile/apyrogeic saline solution.

After neutralization of the auxiliary chemical substances, a second endotoxin sample (s2) was taken from the root canals. Removal of the smear layer was performed with 3 mL of 17% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) solution for 3 minutes, followed by a final flush with 5 mL of sterile/apyrogeic saline solution. Next, the third endotoxin sample (s3) was taken.

Subsequently, the canals were filled with freshly prepared paste of $\text{Ca}(\text{OH})_2$ in saline solution (1:1). The paste was inserted into the canals by using a sterile/apyrogeic Lentulo bur (Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Switzerland). Special attention was paid to complete fill the root canal with the medication. A cotton pellet was used to condense the paste at the canal orifice level and a periapical radiography was performed to ensure the quality of the root canal fill. Next, the access cavities were sealed with light-cured resin composites (3M Dental Products, St Paul, MN, USA). After 30 days of intracanal medication, the canals were aseptically accessed under rubber dam isolation according to the protocol for disinfection, as previously described. The medication was removed with a file size 45, 0.02 taper against the lateral walls of the root canal and copious irrigation with 10 mL of saline solution. Afterwards, a final root canal sampling (s4) was performed.

Determination of endotoxin concentration

The turbidimetric test (Pyrogent 5000[®] Lonza, BioWhitaker, Inc, Walkersville, MD, USA) was used to measure endotoxin concentrations in the root canals according to the LAL technique, as previously published by the authors^{11,13,14}. As a parameter for calculation of the amount of endotoxins in the root canal samples, a standard curve was plotted by using the endotoxin of known concentration supplied by the kit (100 EU/mL), with its dilutions reaching final concentrations (0.01, 0.1, 1, 10 EU/mL) according to the manufacturer's instructions. Firstly, the endotoxin samples were suspended in 1 mL of LAL water supplied by the kit and agitated in vortex for 60 seconds. Next, 100 mL of the blank, followed by the same volume of the standard endotoxin solutions (0.01, 0.1, 1, 10 EU/mL) and 100 mL of the samples, were immediately added in duplicate to a 96-well microplate with their respectively positive controls. To avoid inhibition or enhancement of LAL, a known concentration of *Escherichia coli* endotoxin was added to the clinical samples, as

recommended by the manufacturer's instructions (spike procedure). Both unspiked and spiked samples (positive control) had their endotoxin concentrations automatically calculated. The amount of endotoxins recovered was equal to the known spike concentration, ranging from 50% to 200%. A 96-well microplate (Corning Costar, Cambridge, MA, USA) was placed on a heating block at 37°C and maintained there at this temperature throughout the assay. The test procedure was performed according to the manufacturer's instructions. The absorbance of endotoxins was individually measured by using an enzyme-linked immunosorbent assay plate reader (Ultramark; Bio-Rad Laboratories, Inc, Hercules, CA, USA). During calculation of the endotoxin concentration, the microplate reader monitors the absorbance of each well of the microplate continuously at 340 nm by means of the WinKQCL software (BioWittaker, Cambrex Co, Walkersville, MD, USA). The WinKQCL software automatically performs a log/log linear correlation of the reaction time of each standard curve with its corresponding endotoxin concentration, including printing the standard curve parameters. If the absolute value of the correlation coefficient (r) is 0.980, a polynomial model can be used to construct a standard curve and, in turn, predict endotoxin concentrations of the samples.

Statistical analysis

The data obtained with LAL assay were statistically analyzed by using the SAS Software, version 9.1 (SAS Institute, Cary, NC, USA). The Kolmogorov-Smirnov's test showed that the distributions of the studied variables deviated from the normality. Friedman's test was performed to compare the levels of endotoxin at different sampling times. Wilcoxon's test was used when significant differences were found. Comparison between the experimental groups (GI, GII and GIII) was performed by using the Kruskal-Wallis' test. Significance level was set at 5% ($p < .05$).

RESULTS

Table 1 provides an overview of the individual median values of EU/mL found in root canals of teeth with chronic apical periodontitis at different sampling times. Particular information of the median percentage values of endotoxin reduction at the different sampling times is shown in Table 2. For validation of the LAL assay, the standard curve fulfilled the criteria of linearity ($r=1$) for all assays, as reported by the guidelines. The LAL assay indicated that endotoxins were present in 100% of the root canals investigated (30/30), with a median value of 18.7 EU/mL, ranging from 0.16–82.1 EU/mL.

After root canal instrumentation (s2), a significant median percentage reduction was observed in all groups, irrespective of the irrigant tested: 2.5% NaOCl (99.65%) (GI), 2% CHX (94.27%) (GII), and SS (96.79%) (GIII) (all $p<.05$) (Table 2). No differences were found among the irrigants used.

Root canal rinse with 17% EDTA (s3) for a 3-minutes period failed to decrease endotoxin levels in GI. However, after its use, there was a slight reduction of endotoxins in in GII (59%) and GIII (61.1%) (all $p>.05$).

Intracanal medication for 30 days (s4) was able to significantly reduce residual endotoxins: 2.5% NaOCl (90%) (GI), 2% CHX (88.8%) (GII), and SS (85.7%) (GIII, $p<.05$) comparing to s3. However, no differences were found in the endotoxin reduction when comparing s2 with s4.

Comparing the results gotten after intracanal medication with those found in the baseline (s1), a higher percentage of endotoxin removal was achieved as follows: 2.5% NaOCl (99.9%) (GI), 2% CHX (99.4%) (GII), and SS (99.9%) (GIII) (Table 2).

DISCUSSION

The present study monitored in the same teeth the levels of endotoxins after each endodontic procedure, providing particular information on the effectiveness of

every phase of the root canal therapy. Furthermore, the results found will allow a further development of clinical protocols to enhance detoxification.

For this purpose, the LAL assay was used to measure the levels of endotoxins and to evaluate the effect of root canal procedures on its removal. Among the LAL methods, the turbidimetric method (Pyrogen-5000[®]), which presents a wide range of detection (0.01 to 100 EU/mL), proved to be sensitive and effective in recovering endotoxin from endodontic samples even at very low concentrations.

In our study, endotoxin was recovered from all root canal samples collected from infected root canals, as reported in previous studies^{6-9,13-14,21,25}. At the baseline samples, endotoxin was detected in a median value of 18.7 EU/mL. After chemomechanical preparation, statistically significant percentage values of endotoxin reduction were achieved by the root canal instrumentation with rotary Mtwo files accomplished by 2.5% NaOCl (99.65%), 2% CHX gel (94.27%) as well as saline solution (96.79%). It must be highlighted that the root canal preparation with an inert irrigant (saline solution) obtained a great percentage reduction with no differences among the antimicrobial substances tested. In the face with the “no-detoxifying” ability of NaOCl and CHX, it seems reasonable to assume that the chemical action of these irrigants is critical for the removal of intracanal bacteria^{14,29}, but not a relevant factor regarding endotoxin removal. In accordance with previous studies^{6,11,13,15,25}, our results showed that mechanical action of the endodontic instruments associated with the physical action of the root canal irrigation seems to play a role in the endotoxin removal from infected root canals.

It is worth to mention that the apical limit of the root canal instrumentation exerts a direct influence in endotoxin removal¹¹. Particularly in cases of pulpal necrosis associated with a periapical lesion, as evaluated by this study, the establishment of the working length up to the full extension of the root canal, rather than 1 mm from the apical foramen, might have ensured a better debridement by the mechanical action of the instruments compared to previous investigations^{6,14,29}.

During and after root canal instrumentation it is necessary to remove both the organic and inorganic remnants by the use of chelating agents [ie, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)]¹⁷. EDTA strongly chelates with Ca²⁺ and other divalent cations¹, demineralizes dentin and penetrates into deeper layers (130 µm) of dentin did not prepared chemomechanically²⁵. Due to its properties, we hypothesized that EDTA might contribute for the endotoxin removal from root canal walls during endodontic treatment. However, no significant differences were observed in the percentage values of endotoxin reduction after the use of 17% EDTA when compared with the reduction obtained after root canal instrumentation, agreeing with the findings of Sousa, et al.²⁵ (2014).

It is reported that the use of EDTA alone is not effective for complete removal of the smear layer, in both young and old dentin, but the combination with NaOCl seems to be the best cleansing approach¹⁷. Surprisingly, our results showed that 17% EDTA failed to decrease endotoxin levels in the NaOCl group after smear layer removal. It is known that the decalcifying efficacy of acids and chelating agents depends largely on application time, the pH and concentration of the solution, and the hardness of dentin¹⁸. In addition, sclerosis of dentin is another important factor that affects the efficiency of demineralizing agents²⁷.

In this study, root canal preparation was able to drastically reduce endotoxins, despite not eliminating all content. It is known that minimal amounts of endotoxins can express potent bioactivity and thus maintain an inflammatory process^{9,11-13}. Calcium hydroxide is arguably the most commonly intracanal medication used and seems to be clinically beneficial when endotoxin is suspected in a canal². Due to its very alkaline pH of 10–12, Ca(OH)₂ neutralizes LPS by hydrolysis of ester bonds in the lipid A chains. The slightest variation of the fatty acid chains of the bioactive molecule's lipid A portion renders the entire molecule biologically inactive².

The ability of calcium hydroxide medication for 30 days to improve the endotoxin reduction from root canals of teeth with chronic apical periodontitis was

demonstrated by the present study. After 30 days of Ca(OH)₂ medication, the levels of endotoxins were reduced to a median percentage value of 99.9% (NaOCl and SS) and 99.4% (CHX) with no differences between the endotoxin reduction achieved immediately after root canal preparation. However, an extended use of the intracanal medication for 30 days in chronic cases, as shown by the present study and in acute cases as evaluated by Sousa, et al.²⁵ (2014), compared with a 7 day-medication by Vianna, et al.²⁹ (2007), seemed to be important for a better *in vivo* endotoxin reduction activity of Ca(OH)₂.

In conclusion, our findings demonstrated the effectiveness of the mechanical action of instruments together with the flow and back-flow of an irrigant enduring root canal instrumentation for endotoxin removal from root canals of teeth with chronic apical periodontitis. Moreover, the use of intracanal medication for 30 days contributed for an improvement of the endotoxin reduction.

REFERENCES

1. Berutti E, Marini R, Angeretti A. Penetration ability of different irrigants into dentinal tubules. *J Endod.* 1997;23:725-7.
2. Buck RA, Cai J, Eleazer PD, Staat RH, Hurst HE. Detoxification of endotoxin by endodontic irrigants and calcium hydroxide. *J Endod.* 2001;27:325-7.
3. Burton AJ, Carter HE. Purification and characterization of the lipid A component of the lipopolysaccharides from *Escherichia coli*. *Biochemistry.* 1964;3:411-8.
4. Csako G, Elin RJ, Hochstein HD, Tsai CM. Physical and biological properties of U.S. standard endotoxin EC after exposure to ionizing radiation. *Infect Immun.* 1983;41:190-6.
5. Gomes BP, Endo MS, Martinho FC. Comparison of endotoxin levels found in primary and secondary endodontic infections. *J Endod.* 2012;38:1082-6.
6. 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;35:1350-3.
7. Hong CY, Lin SK, Kok SH, Cheng SL, Lee MS, Wang TM, et al. The role of lipopolysaccharide in infectious bone resorption of periapical lesion. *J Oral Pathol Med.* 2004;33:162-9.
 8. Horiba N, Maekawa Y, Abe Y, Ito M, Matsumoto T, Nakamura H. Correlations between endotoxin and clinical symptoms or radiolucent areas in infected root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1991;71:492-5.
 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;54:777-83.
 10. Lüderitz O, Tanamoto K, Galanos C, McKenzie GR, Brade H, Zähringer U, et al. Lipopolysaccharides: structural principles and biologic activities. *Rev Infect Dis.* 1984;4:428-3.
 11. Marinho AC, Martinho FC, Zaia AA, Ferraz CC, Gomes BP. Influence of the apical enlargement size on the endotoxin level reduction of dental root canals. *J Appl Oral Sci.* 2012;20:661-6.
 12. Martinho FC, Chiesa WM, Leite FR, Cirelli JA, Gomes BP. Antigenic activity of bacterial endodontic contents from primary root canal infection with periapical lesions against macrophage in the release of interleukin-1beta and tumor necrosis factor alpha. *J Endod.* 2010;36:1467-74.
 13. Martinho FC, Chiesa WM, Marinho ACS, Zaia AA, Ferraz CC, Almeida JF, 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;36:1766-9.
 14. 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;34:268-72.

- 15.Oliveira LD, Carvalho CA, Carvalho AS, Alves JS, Valera MC, Jorge AO. Efficacy of endodontic treatment for endotoxin reduction in primarily infected root canals and evaluation of cytotoxic effects. *J Endod.* 2012;38:1053-7.
- 16.Oliveira LD, Jorge AO, Carvalho CA, Koga-Ito CY, Valera MC. *In vitro* effects of endodontics irrigants on endotoxins in root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007;104:135-42.
- 17.Ozdemir HO, Buzoglu HD, Calt S, Cehreli ZC, Varol E, Temel A. Chemical and ultramorphologic effects of ethylenediaminetetraacetic acid and sodium hypochlorite in young and old root canal dentin. *J Endod.* 2012;38:204-8
- 18.Paredes-Vieyra J, Enriquez FJ. Success rate of single- versus two-visit root canal treatment of teeth with apical periodontitis: a randomized controlled trial. *J Endod.* 2012;38:1164-9.
- 19.Pérez-Heredia M, Ferrer-Luque CM, González-Rodríguez MP, Martín-Peinado FJ, González-López S. Decalcifying effect of 15% EDTA, 15% citric acid, 5% phosphoric acid and 2.5% sodium hypochlorite on root canal dentine. *Int Endod J.* 2008;41:418-23.
- 20.Petsch D, Anspach FB. Endotoxin removal from protein solutions. *J Biotech.* 2000;76:97-119.
- 21.Pitts DL, Williams BL, Morton TH Jr. Investigation of the role of endotoxin in periapical inflammation. *J Endod.* 1982;8:10-8.
- 22.Schein B, Schilder H. Endotoxin content in endodontically involved teeth. *J Endod.* 2006;32:293-5.
- 23.Silva LA, Leonardo MR, Assed S, Tanomaru-Filho M. Histological study of the effect of some irrigating solutions on bacterial endotoxin in dogs. *Braz Dent J.* 2004;15:109-14.
- 24.Silva LA, Nelson-Filho P, Leonardo MR, Rossi MA, Pansani CA. Effect of calcium hydroxide on bacterial endotoxin *in vivo*. *J Endod.* 2002;28:94-8.
- 25.Sousa EL, Martinho FC, Nascimento GG, Leite FR, Gomes BP. Quantification of endotoxins in infected root canals and acute apical

- abscess exudates: monitoring the effectiveness of root canal procedures in the reduction of endotoxins. *J Endod.* 2014;40:177-81.
26. Tanomaru JM, Leonardo MR, Tanomaru Filho M, Bonetti Filho L, Silva LA. Effect of different irrigation solutions and calcium hydroxide on bacterial LPS. *Int Endod J.* 2003;36:733-9.
27. Thaler A, Ebert J, Petschelt A, Pelka M. Influence of tooth age and root section on root dentine dye penetration. *Int Endod J.* 2008;41:1115-22.
28. Vera J, Siqueira JF Jr, Ricucci D, Loghin S, Fernández N, Flores B, et al. One- versus two-visit endodontic treatment of teeth with apical periodontitis: a histobacteriologic study. *J Endod.* 2012;38:1040-52.
29. 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;22:411-8.
30. Xavier AC, Martinho FC, Chung A, Oliveira LD, Jorge AO, Valera MC, et al. One-visit versus two-visit root canal treatment: effectiveness in the removal of endotoxins and cultivable bacteria. *J Endod.* 2013;39:959-64.

Table 1- Distribution of the median values of endotoxins (EU/mL) found in primarily infected root canals at all different sampling times

Groups	Initial (S1)	After root instrumentation (S2)	After 17% EDTA (S3)	After medication (S4)
	Median (CB 95%)	Median (CB 95%)	Median (CB 95%)	Median (CB 95%)
NaOCl (I)	25.80 (13.75 – 51.47)	0.08 (0.03 – 0.15)	0.1 (0.1 – 0.23)	0.01 (0.01 – 0.03)
CHX (II)	18.65 (8.41 – 44.35)	0.66 (0.48 – 1.31)	0.27 (0.14 – 0.85)	0.06 (0.01 – 1.2)
SS (III)	13.95 (-2.08 – 73.53)	0.18 (-4.85 – 13.33)	0.07 (0.03 – 0.15)	0.01 (-0.01 – 0.19)

S1 – Before instrumentation; S2 = After instrumentation; S3= After use of 17% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA); S4- after 30 days of intracanal medication (Ca(OH)₂ + SS); CB (confidence bound)

Table 2- Distribution of the median percentage values of endotoxins reductions found in primarily infected root canals after different sampling times

S1 to S2 (%)	S2 to S3 (%)	S3 to S4 (%)
Median (CB 95%)	Median (CB 95%)	Median (CB 95%)
99.65 (99.28 – 99.83) ^{Aa}	No improvement	90 (88.92 – 100.00) ^{Aa}
94.27 (65.13 – 101.99) ^{Aa}	59 (46.10 – 64.20) ^{Ab}	88.8 (84.06 – 119.59) ^{Aac}
97.22 (74.77 – 105.73) ^{Aa}	61.1 (51.04 – 69.79) ^{Ab}	85.7 (83.08 – 100.16) ^{Aac}

*Different letters means statistical significant differences ($p < 0.05$); CB (confidence bound)

2.5 Artigo 5- Detection and function of lipopolysaccharide and its purified lipid A after treatment with auxiliary chemical substances and calcium hydroxide dressings used in endodontic therapy

Artigo submetido ao periódico Journal of Endodontics

Marinho AC, To T, Darveau RP, Gomes BP.

Introduction: The host innate immunity is significantly altered in response to minor structural modifications of lipid A. This study was conducted to investigate the influence of auxiliary chemical substances and calcium hydroxide dressings on LPS and lipid A detection and its further functional ability in activating Toll-like receptor 4. **Methods:** *Fusobacterium nucleatum* pellet was exposed to different antimicrobial agents selected from those commonly used for endodontic therapy, categorized as following: Auxiliary chemical substances: 5.25%, 2.5% and 1% sodium hypochlorite solutions (NaOCl), 2% chlorhexidine (CHX) (gel and solution) and 17% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA); Intracanal medicament: calcium hydroxide [$\text{Ca}(\text{OH})_2$] suspended in a cellulose/water gel matrix (PulpDent Multical[®]) for different periods of incubation (1h, 24h, 7 days, 14 days and 30 days). Association of substances was also evaluated by the following protocols: a) 2.5% sodium hypochlorite- for 1h, followed by 17% EDTA rinse- for a 3min-period and ultimately by $\text{Ca}(\text{OH})_2$ dressing for 7 days; b) 2% chlorhexidine- for 1h, afterwards, a pellet rinse with 17% EDTA- for a 3min-period followed by $\text{Ca}(\text{OH})_2$ dressing for 7 days. Control was performed by re-suspending the pellet into sterile/LPS-free saline solution. Each sample was submitted to LPS isolation and further lipid A purification. Presence and intensity of lipid A peaks were assessed by MALDI-TOF MS in conjunction to SDS-PAGE separation and silver staining of LPS. TLR4 activation determined the corresponding function activities. Statistical comparisons were carried out by one-way analysis of variance with Tukey-Kramer post hoc test at the 5% significance level. **Results:** MALDI-TOF MS analysis of control *F. nucleatum* lipid A demonstrated the ion cluster at mass/charge (m/z) 1882 and a

very intense band in SDS-PAGE followed by silver staining. In parallel, a robust TLR4 activation was observed in response to control when compared to other experimental substances ($p \leq 0.001$). 5.25% NaOCl treatment led to absence of lipid A spectral peak and LPS band, while no changes occurred to lipid A after treatment with 2.5% and 1% NaOCl, 2% CHX either gel or solution and also with 17% EDTA. Concomitantly, 5.25% NaOCl treated LPS did not activate TLR4 ($p < 0.0001$). As to dressings of $\text{Ca}(\text{OH})_2$, lipid A was not detected by MALDI-TOF nor by gel electrophoresis within 24h of bacterial exposure. LPS treated with calcium hydroxide was a weak TLR4 agonist in HEK cells ($p < 0.0001$). From 24h onwards, no significant differences were found among the different periods tested ($p > 0.05$). The addition of $\text{Ca}(\text{OH})_2$ for 7 days to bacterial pellet treated either with 2.5% NaOCl or 2% CHX, both substances followed by EDTA, led to the absence of lipid A mass spectra and bands after silver staining leading to a lower activation of TLR4. **Conclusion:** 5.25% NaOCl and calcium hydroxide dressings from 24h onwards are able to induce both loss of lipid A peaks and LPS detection, rendering a diminished immunostimulatory activity through TLR4.

Key-words: Endodontics, LPS, Lipid A, Toll-like receptor.

INTRODUCTION

Lipopolysaccharides (LPSs), a major component of the outer membrane of Gram-negative bacteria, play an important role in determining the severity of apical periodontitis upon a substantial amount of clinical evidence (1-6). In general, bacterial LPS are composed of three structural domains: lipid A, core and O-antigen repeat (7-10). Lipid A is an immunomodulative factor and initiates inflammatory signaling pathway by binding toll-like receptor 4 (TLR4), according to the structure of acyl chain (11,12).

Recognition of lipid A by TLR4 facilitates a robust proinflammatory response by the host immune system that promotes clearance of the bacteria from infected tissues (13). Accordingly, binding of LPS to the TLR4 complex leads to an intracellular signaling cascade that result in the release of a number of pro-inflammatory cytokines that contribute to increase the expression of adhesion factors on endothelial cells (10,11,14,15). This is important for detection and removal of the invading pathogen and should benefit the host by the recruitment and activation of cells and factors that aid in pathogen clearance. However, a prolonged or excessive immune response can lead to disease conditions (7,10,12,14,15).

Although lipid A is considered to be the most conserved moiety of the LPS molecule (10), recent studies on the lipid A structure- function relationships have shown that subtle modifications in lipid A molecule such as changing the number,

position, or length of the primary or secondary acyl groups, or subtraction of phosphate or monosaccharide are linked to alteration of the activities on TLR4 signaling and its consequent biologic effects (8, 10,11, 16,17).

Due to the complexity of the root canal system, it is impossible to eliminate LPS by instrumentation alone, needing the adjunctive use of root canal irrigation with topical auxiliary chemical substances (2,18). Considering the role of LPS in the pathogenesis of periapical lesion, its removal from infected root canal seems to favor the healing process of periapical tissues (1, 3, 18,19-21). Nevertheless, even when treatment has followed proper standards, endotoxins can persist in root canals walls still after microorganisms are rendered nonviable (18-21). Nowadays, it is well established in the literature the effectiveness of the mechanical action of the instruments with an increase in preparation size, associated with the streaming of the irrigant, for a great reduction of intracanal LPS (2,18), despite not eliminating its total load (18-21). However, there is a lack of data regarding the real chemical effect of the irrigant substances and intracanal medicaments (either individually or in combination of clinical protocols) on LPS structure disruption, without considering the effect of the flow and backflow of the irrigant solutions on the LPS removal from the root canals . As host cells differentiate slight structural changes in lipid A (9-11), it would be of interest to investigate the plasticity of LPS molecules exposed to such antimicrobial agents used in the endodontic therapy, and their further ability to stimulate pro-inflammatory host responses.

Therefore, this study was conducted to evaluate the influence of auxiliary chemical substances and calcium hydroxide dressings on LPS and lipid A detection and its further functional ability on TLR4 activation.

MATERIAL AND METHODS

Bacterial strain and growth condition

The Gram-negative bacterium, *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586, was obtained from a frozen stock collection. Bacteria were grown in TYHK medium consisting of 40 mg·mL⁻¹ trypticase soy broth (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA), 5 mg·mL⁻¹ yeast extract (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA), and 1 µg·mL⁻¹ vitamin K₃ (menadione) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The basal TYK medium was sterilized by autoclaving, followed by the addition of filter-sterilized hemin (Sigma- Aldrich) to a final concentration of 1 µg·mL⁻¹. Cultures were grown in an anaerobic growth chamber (5% H₂, 5% CO₂, 90% N₂) and maintained at 37°C for 48h. The turbidity of the medium during the incubation period indicated bacterial growth. The purity of the cultures was confirmed by colony morphology on TYHK agar plates and Gram staining. Daily measurements of the optical density at 600nm were performed. The cell suspensions were measured spectrophotometrically and the optical density equivalent to ± 2.0 was standardized.

Bacterial exposure to antimicrobial substances

A total of 200 mL of bacterial culture was centrifuged at 7000 rpm in order to obtain the bacterial pellet. Afterwards, cells were rinsed once with sterile/LPS- free water and re-suspended in antimicrobial agents selected from those commonly used for endodontic therapy, as follows:

Auxiliary chemical substances: 5.25% sodium hypochlorite (NaOCl), 2.5% sodium hypochlorite (NaOCl), 1% sodium hypochlorite (NaOCl), 2% chlorhexidine (CHX) gel [gel base: 1% natrosol (hydroxyethylcellulose base)] and solution and 17% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). All substances were prepared 24 h before the beginning of the experiment. A total of 5 mL of each substance was transferred to individual test tubes containing the bacterial cells and maintained at 37°C for 1h. Control was performed by re-suspending the cells into 5mL of sterile saline solution (0.9% NaCl control irrigant, LPS control) (Table1).

Intracanal Medicament Calcium hydroxide [(Ca(OH)₂] suspended in a cellulose/water gel matrix (PulpDent Multical- Pulpdent Corporation, MA, USA). 1 mL of Ca(OH)₂ paste was transferred to individual test tubes containing the bacterial cells and maintained at 37°C for different periods of incubation, as follow: 1h, 24h, 7, 14 and 30 days. All test tubes were daily vortexed for 5 minute to ensure its complete mixture with bacterial cells.

Association of substances: In order to reproduce a multiple-visit treatment used for root canal preparation, in which several substances are incorporated, the pellet was subsequently treated with the following protocols: a) A total of 5 mL of 2.5% sodium hypochlorite- for 1h, followed by 5 mL of 17% EDTA - for a 3min-period and ultimately by 1 mL of $\text{Ca}(\text{OH})_2$ for 7 days; b) A total of 5 mL of 2% chlorhexidine- for 1h, afterwards, a pellet rinse with 5 mL of 17% EDTA- for a 3min-period followed by 1 mL $\text{Ca}(\text{OH})_2$ dressing for 7 days.

After cells treatment, the tubes were centrifuged at 11000 rpm and the supernatant of each substance was discarded. Treated cells were washed twice with 10 mL of LPS-free water in order to eliminate residues of chemical substances. When association of substances was tested, each individual substance was completely removed by centrifugation and then, a pellet washing with 10 mL of LPS- free water was performed before each consecutive step, as previously described. Afterwards, all treated pellets were individually submitted to LPS isolation.

Isolation of LPS

LPS was isolated using a modified version of the Tri- reagent protocol for LPS isolation as previously described (22). The pellet was re-suspended in 1 mL of TRI Reagent (Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, OH), a commercial preparation of phenol and guanidine thiocyanate. After thorough mixing, 1/5

volume of chloroform was added and mixed. The mixture was centrifuged for 10 min at 12 000 rpm in a standard tabletop microcentrifuge, and the top, aqueous layer was retained. LPS-free water was used to re-extract the mixture twice more, and the pooled aqueous phases were lyophilized to recover “crude LPS”. Crude LPS was then washed once with cold 0.375 M MgCl₂ in 95% EtOH, centrifuged at 4° C at 5000 rpm for 5 min., and washed thrice more with cold 95% EtOH followed by a final wash with cold 100% EtOH. After drying, the LPS was subjected to a modified Folch extraction to remove contaminating phospholipids (23). Briefly, LPS was resuspended to 1% (w/v) in Folch reagent (2:1 ratio of chloroform: MeOH), centrifuged at 4° C. at 10 000 rpm for 5 min., and air dried. The final product was re-suspended in water and considered to be “purified LPS.”

Lipid A purification

Lipid A was purified by a mild acid hydrolysis, as described previously (23). Briefly, 500 µL of 1% SDS in 10 mM sodium acetate (pH 4.5) was added to 1–3 mg of purified LPS and incubated at 100° C. for 1 hr. After this, the solution was frozen and lyophilized. Next, the dried material was re-suspended in 100 µL LPS-free water and 1 mL of cold, acidified 95% EtOH (made by adding 100 µL of 4 N HCl to 20 mL of 95% EtOH) and centrifuged at 4° C. at 5000 rpm for 5 min. The supernatant was discarded, and the lipid A was washed thrice more with cold 95% EtOH. All four washes were repeated, followed by a final wash with cold 100% EtOH. The purified lipid A was then dried and used for MALDI analysis.

Structural analysis of lipid A by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS)

Lipid A samples were dissolved in 10 μL of a solution containing the matrix, 5-chloro-2-mercaptobenzothiazole ($20 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), dissolved in a mixture of chloroform/methanol 1:1 (V/V). A total of 0.5 μL of each sample was spotted onto a polished steel target MALDI plate. After co-crystallizing the sample matrix, obtained by air drying the spots at room temperature, the samples were analyzed in negative ion reflectron mode on an AutoFlex Analyzer II (Bruker Daltonics Inc., Billerica, MA, USA). Instrument calibration and all other tuning parameters were optimized using HP Calmix (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Detected ion peaks were acquired with a 50 Hz repletion rate and up to 3,000 shots were accumulated for each spectrum. Spectral profiles were smoothed and the baseline subtracted.

Structural analysis of LPS by Silver-stained SDS-Polyacrylamide Gels

To compare the patterns for lipopolysaccharides, sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE; 12% polyacrylamide gel) was performed, and the LPS was stained with silver nitrate according to the method reported by Tsai & Frasch (24). A total of 0.67mg/mL of each purified LPS was used per lane. The running buffer consisted of 0.025 M Tris, 0.2 M glycine, and 0.1% SDS. The gels were run in a Mini-Protein III dual slab cell (Bio-Rad,

Hercules, CA, USA) at a constant current of 35 mA per slab gel using a Power PAC 300 (Bio-Rad). Following electrophoresis, gels were fixed in 50 mL of 0.7% periodic acid in 30% ethanol (EtOH) and 10% acetic acid solution (HAc) for 10 min. Then, gels were washed with 100 mL deionized water (DW) for 2 × 5 min, impregnated in 100 mL 0.2% silver nitrate for 10 min, washed in 100 mL of DW for 2 × 20 s, and immersed in 100 mL of an aqueous solution containing 0.05% formaldehyde and 10% HAc for 5–8 min to develop image. After silver ion reduction, gels were immersed in 10% HAc for 1 min to stop the development. Analysis of LPS bands was performed using a white-light scanner (UMAX Power-Look 2100XL, Umax Systems GmbH, Willich, Germany) connected to a computer for the analysis of band intensity.

TLR4 Activation Function Assay

Human embryonic kidney (HEK) 293 cells were plated in 96-well plates at a density of 4×10^4 cells per well and transfected the following day with plasmids bearing firefly luciferase, Renilla luciferase, human TLR4 and MD-2 by a standard calcium phosphate precipitation method, as described by Jain et al. (2013) (10). After overnight growth, cells expressed the TLR receptor complexes and were stimulated with LPS preparation (1,000 µg/mL) in triplicates for 4 h. Following stimulation, the HEK 293 cells were rinsed with phosphate-buffered saline and lysed with 50 µl of passive lysis buffer (Promega, Madison, WI, USA). Luciferase activity was measured using the Dual Luciferase Assay Reporter System

(Promega, Madison, WI, USA) in a Centro LB 960 Microplate Luminometer (Berthold Technologies GmbH & Co. KG, Bad Wildbad, Germany). Data are expressed as fold increase of NF- κ B activity which represents the ratio of NF- κ B-dependent firefly luciferase activity to β -Actin promoter-dependent Renilla luciferase activity.

Statistical analysis

Data points for TLR4 activation studies were plotted and analyzed with GraphPad Prism version 6.03 for MacOS X (Graphpad Software San Diego, CA, USA). Statistical comparisons were carried out by one-way analysis of variance with Tukey-Kramer post hoc test at the 5% significance level.

RESULTS

Structural analysis of lipid A by MALDI-TOF MS

Negative-ion mass spectra gathered from lipid A treated by auxiliary chemical substances and calcium hydroxides dressing are shown in Figure 1. Based on the known structure of lipid A from *F. nucleatum* LPS (control, saline treatment), MALDI-TOF MS analysis demonstrated a predominant ion cluster at m/z 1882, consistent with previous reports (25, 26). LPS treatment with the highest concentration of NaOCl - 5.25% - showed absence of lipid A spectral peaks. After treatment with 2.5% and 1% NaOCl, 2% CHX either gel or solution and also after

17% EDTA lipid As were still present similar to control (Figure 1). In contrast, after 1h-period of bacterial exposure to calcium hydroxide, it was shown several small peaks with reduced molecular mass and intensity (Figure 2). Moreover, after 24h of incubation, lipid A was no longer detected. Analysis of association of substances showed that the incorporation of Ca(OH)_2 for 7 days to the bacterial pellet treated either with 2.5% NaOCl + EDTA or with 2% CHX + EDTA, obtained the greatest outcome, corresponding to the absence of lipid A spectral peaks.

Structural analysis of LPS by SDS-PAGE separation and silver staining

Figure 3 provides an overview of the silver stained gel of the electrophoresis of LPS treated with auxiliary chemical substances of endodontic therapy and calcium hydroxide paste. LPS control demonstrated a ladder pattern of banding characteristic of gram negative bacteria. Similarly to control, LPS treated by 2.5% NaOCl, 1% NaOCl, 2% CHX either gel or solution and also by 17% EDTA stained very intensely and appeared as black region at the bottom of gel. No band was detected in the samples corresponding to 5.25% NaOCl treatment or to calcium hydroxide treatment from 24 h to 30 days. These results were consistent with those from MALDI-TOF MS.

The combination of the alkali treatment for 7 days to bacterial cells treated either with 2.5% NaOCl or 2% CHX - both followed by EDTA, removed the lipid component from LPS, showing an absence of bands after silver staining.

TLR4 Activation Function Assay

Regarding auxiliary chemical substances, LPS from cells treated with saline displayed a more potent TLR4 activation than those treated by other experimental substances ($p \leq .001$) (Figure 4). On the other hand, LPS treated with 5.25% NaOCl displayed a less potent TLR4 activation than those treated by other experimental substances ($p \leq .001$). The higher the concentration of NaOCl, the lower TLR4 activation in HEK 293 cells. LPS treated with 2% CHX gel did not differ from 1% NaOCl and from 17% EDTA.

Based upon the data shown in Figure 4, there was no significant difference in HEK cell activation among the different periods of LPS exposure to calcium hydroxide (1h, 24h, 7, 14 and 30 days) ($p > .05$). Analysis of association of substances on LPS, revealed that HEK cells displayed significant decrease in activation when a dressing of calcium hydroxide paste was added in the protocol of treatment, either using NaOCl or CHX ($p \leq .0001$). After Ca(OH)_2 dressing for 7 days no difference was observed between NaOCl and CHX protocols in TLR activation ($p > 0.05$).

DISCUSSION

This study attempted to find out whether LPS structure becomes modified via chemical treatment with commonly used substances during endodontic therapy, either alone or in combination of protocols, with the goal of reducing and finally eliminating the toxicity. Previously, numerous studies focused on the ability of

endodontic irrigants on the quantitative removal of LPS from infected root canals, together with the mechanical action of endodontic instruments and flow and back-flow of irrigants (3,4,18,20-21,27). The present study investigated the isolated action of the chemicals, without flow, in direct contact with LPS in order to elucidate their specific effects on LPS breakdown.

F. nucleatum lipid A has been reported to have a chemical composition similar to the classical structure of enterobacterial lipid A (25,26). Based on recently published literature, *F. nucleatum* lipid A can potentiate a relatively strong TLR4 agonistic response similar to *E. coli* LPS on TLR4 activity (11, 27), and therefore it was selected as a marker of performance.

The reproducibility of the MALDI-TOF MS data was assessed in conjunction to SDS-PAGE separation and silver staining, in order to greatly enhance the study of LPS structure, and to provide a more accurate comparison of the effects of chemicals on LPS molecule. Based on the mass-to-charge ratio (m/z), MALDI-TOF MS generates complex spectra that often contain unique m/z signatures for different microorganisms (28,29). The compatible association of these methods is one of the most important tools for LPS identification in the low nanogram range (30, 31).

Auxiliary chemical substances

After treatment with control (saline solution), MALDI-TOF MS demonstrated a main ion cluster value at m/z 1882, as expected. Concomitantly, silver stained gel showed a very intense band and appeared as black region at the bottom of gel. In parallel, functional activity of LPS was evaluated via TLR4 activation. Our findings demonstrated a robust TLR4 response when HEK cells were stimulated with LPS treated with saline than those treated by other experimental substances. This result emphasizes the importance of the antimicrobial substance for neutralization of the root canal content prior to the progressive advance of the endodontic files towards the apical third.

Sodium hypochlorite

Currently, the most widely used endodontic irrigant is sodium hypochlorite at concentrations of 0.5–5.25%. Its major acceptance among clinicians is due to its antibacterial and tissue- dissolving properties containing fatty acids and lipids via a saponification reaction, and is strongly alkaline and hypertonic (32-34).

The results of this study are one of the first to show the mass spectra of *F. nucleatum* lipid A treated with different concentrations of NaOCl for 1h. They revealed an absence of peak corresponding to the highest concentration (5.25%), while 2.5% and 1% NaOCl- treated LPS showed a peak similar to saline (control). In accordance with MALDI-TOF MS results, separation over SDS-PAGE followed

by silver staining detected no band corresponding to 5.25% NaOCl- treated LPS. The mechanistic specificity of lipid A degradation might be due to tissue-dissolving property of NaOCl. This property supports the absence of lipid A peak and a non-detected band in 5.25% NaOCl treated samples, when compared to those treated with lower concentrations of NaOCl. Indeed, at the end of incubation period (1h), it was observed an intense pellet dissolution related to 5.25% NaOCl sample. This finding suggests that a longer period of contact of this solution would be required for a more effective and complete dissolving action of LPS molecule.

Functional activity by TLR4 reporter demonstrated a diminished immunostimulatory activity related to 5.25% NaOCl treated- LPS. Interestingly, decreasing the concentration of NaOCl, we observed a higher TLR4 activation. It reaffirms the role of a high concentrated NaOCl solution for a lower stimulatory behavior of LPS towards immune cells. It has to be taken into account that the greater the concentration of NaOCl the more severe is the potential reaction that may happen if some of the irrigant is accidentally forced into the periapical tissues (34-36). We also presume that the tissue-dissolving ability of NaOCl on lipid A molecule might impair the binding of LPS to TLR4, and thereby, modulating TLR4 activation.

Chlorhexidine

MALDI-TOF MS analysis demonstrated a predominant ion cluster at m/z 1879 either for 2% CHX gel or solution (Figure 1 E and F). The slight difference in

the mass-to-charge-ratio of 2% CHX isoforms, when compared to control, demonstrates oxidation of the molecule after treatment. Nevertheless, no changes were observed in the relative intensity of the lipid A peak. This is in line with silver stained gel which, in turn, allowed sharp definition of the electrophoretic pattern of the band profile with the two forms of CHX studied.

Regarding immunostimulatory effects, 2% CHX gel or solution- treated LPS was a mild stimulator of TLR4 activation compared to LPS treated with saline, over a dosage range of 100 µg/ml to 1000 µg/ml. There were no significant differences between 2% CHX gel and solution regarding function activities.

EDTA

MALDI-TOF MS demonstrated no variation in m/z value or peak intensities in lipid A after 17% EDTA for 3 min of contact with *F. nucleatum* pellet. The silver stain showed major bands corresponding to 17% EDTA. Furthermore, LPS treated with 17% EDTA activated TLR4 higher than 2.5% NaOCl and 2% CHX gel. Our results showed that EDTA has no impact on modifying the LPS structure. Regardless of the auxiliary chemical substance, NaOCl or CHX, it is necessary to remove both the organic and inorganic remnants, known as smear layer, after chemomechanical preparation by the use of chelating agents (ie, ethylenediaminetetraacetic acid [EDTA]) (4,18, 35-40). Marinho et al. (18) demonstrated that EDTA is essential in the endodontic disinfection protocol, once after EDTA rinse there was no difference between NaOCl and CHX as main

irrigant regarding the endotoxin reduction. According to our findings, we assume that the chelating property is the keystone for EDTA indirect removal of LPS adhered to the root canal walls.

Intracanal medicament

Dressing the canal with calcium hydroxide has been shown to decrease LPS levels left by the chemo-mechanical preparation (18). Due to alkaline pH of 10–12 of calcium hydroxide, LPS treatment with this alkali removes more than 90% of the ester-linked fatty acids from the lipid A moiety, as a result of LPS breakdown (39). The results of this study support this theory because no negatively charged lipid A fragments could be detected by the mass spectrometer with lipid A samples treated by $\text{Ca}(\text{OH})_2$ paste from 24h up to 30 days. We found that after one hour, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ paste induced fragmentation of lipid A, seen by several small peaks with lower mass and intensity. From 24h onwards, neither MALDI-TOF MS nor the silver stained gel revealed the presence of lipid A and LPS, respectively. No activation was found at any incubation time of exposure (1h, 24h, 7, 14 and 30 days).

Many of today's controversies are about the extent to which calcium hydroxide might remain inside the root canal. The present work demonstrated that calcium hydroxide associated to a viscous vehicle requires a minimum period of 24h in direct contact to induce changes in the lipid A moiety and complete LPS neutralization.

Association of substances

Through association of substances on bacterial cells, we found a slight increase of activation of TLR4 activation when 17% EDTA was added in the protocol of treatment, either to NaOCl or CHX.. Considering that LPS molecules possesses the tendency to aggregate, treatment with EDTA might have enhanced LPS binding to TLR4, and therefore, contributing for an increasing response in the present study.

After addition of Ca(OH)_2 for 7 days to bacterial pellet treated either with 2.5% NaOCl or 2% CHX, both substances followed by EDTA, lipid A peak and bands were not detected, revealing a drastic decrease of the response by HEK. Taken together, our findings reinforce the role played by calcium hydroxide on lipid A cleavage and neutralization. After Ca(OH)_2 dressing, no differences were found between NaOCl and CHX protocols regarding TLR4 activation.

In conclusion, under laboratorial conditions, 5.25% NaOCl and calcium hydroxide dressings were able to induce both, loss of lipid A peaks and LPS detection, rendering a diminished immunostimulatory activity through TLR4.

REFERENCES

1. Siqueira JF Jr, Rôças IN, Ricucci D, Hülsmann M. Causes and management of post-treatment apical periodontitis. *Br Dent J* 2014; 216:305-12.

2. Marinho ACS, Marinho FC, Zaia AA, Ferraz CCR, Gomes BPFA. Influence of the apical enlargement size on the endotoxin level reduction of dental root canals. *J Appl Oral Sci* 2012;20: 661-6.
3. Marinho FC, Chiesa WMM, Marinho ACS, Zaia AA, Ferraz CCR, Almeida JFA 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; 36: 1766-9.
4. Hong CY, Lin SK, Kok SH, Cheng SL, Lee MS, Wang TM, Chen CS, Lin LD, Wang JS. The role of lipopolysaccharide in infectious bone resorption of periapical lesion. *J Oral Pathol Med* 2004; 33:162-9.
5. Horiba N, Maekawa Y, Abe Y, Ito M, Matsumoto T, Nakamura H. Correlations between endotoxin and clinical symptoms or radiolucent areas in infected root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1991; 71: 492-5.
6. Garlet GP. Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a reappraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. *J Den Res* 2010;89:1349-63.
7. Darveau, RP. Oral innate host defense responses: interactions with microbial communities and their role in the development of disease H. K. 2000;169-218.
8. Dixon DR, Darveau RP. Lipopolysaccharide heterogeneity: innate host responses to bacterial modification of lipid a structure. *J Dent Res* 2005;84:584-95.
9. Jain S, Darveau RP. Contribution of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide to periodontitis. *Periodontol* 2010;54:53-70.
10. Jain S, Coats SR, Chang AM, Darveau RP. A novel class of lipoprotein lipase-sensitive molecules mediates Toll-like receptor 2 activation by *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun* 2013; 81:1277-86.
11. To TT, Gumus P, Nizam N, Buduneli N, Darveau RP. Subgingival Plaque in Periodontal Health Antagonizes at Toll

- Like Receptor 4 and Inhibits E Selectin Expression on Endothelial Cells. *Infect Immun.* 2015;120-6.
12. Coats SR, Jones JW, Do CT, Braham PH, Bainbridge BW, To TT, Goodlett DR, Ernst RK, Darveau RP. Human Toll-like receptor 4 responses to *P. gingivalis* are regulated by lipid A 1- and 4-phosphatase activities. *Cell Microbiol.* 2009; 11:1587-99.
 13. Beutler B. TLR4: central component of the sole mammalian LPS sensor. *Curr Opin Immunol.* 2000;12:20-26.
 14. Sawa Y, Yoshida S, Shibata KI, Suzuki M, Mukaida A. Vascular endothelium of human dental pulp expresses diverse adhesion molecules for leukocyte emigration. *Tissue Cell.* 1998; 30:281-91.
 15. Dauphinee SM, Karsan A. Lipopolysaccharide signaling in endothelial cells. *Lab Invest.* 2006;86:9-22. Review.
 16. Hajjar AM, Ernst RK, Tsai JH, Wilson CB, Miller SI. Human Toll-like receptor 4 recognizes host-specific LPS modifications. *Nat Immunol.* 2002;3:354-9.
 17. Lee SH, Baek DH. Antibacterial and neutralizing effect of human β -defensins on *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecalis* lipoteichoic acid. *J Endod.* 2012; 38: 351-6.
 18. Marinho AC, Martinho FC, Leite FR, Nascimento GG, Gomes BP. Proinflammatory Activity of Primarily Infected Endodontic Content against Macrophages after Different Phases of the Root Canal Therapy. *J Endod.* 2015;41:817-23.
 19. Marinho AC, Martinho FC, Zaia AA, Ferraz CC, Gomes BP. Monitoring the effectiveness of root canal procedures on endotoxin levels found in teeth with chronic apical periodontitis. *J Appl Oral Sci.* 2014;22:490-5.
 20. Gomes BP, Endo MS, Martinho FC. Comparison of endotoxin levels found in primary and secondary endodontic infections. *J Endod* 2012;38:1082-6.

21. Gomes BPFA, Martinho FC, Vianna ME. Comparison of 2.5% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine gel on oral bacterial lipopolysaccharide reduction from primarily infected root canals. *J Endod* 2009; 35: 1350-3.
22. Al-Qutub MN, Braham PH, Karimi-Naser LM, Liu X, Genco CA, Darveau RP. Hemin-dependent modulation of the lipid A structure of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide. *Infect Immun*. 2006;74:4474-85.
23. Curtis MA, Percival RS, Devine D, Darveau RP, Coats SR, Rangarajan M, Tarelli E, Marsh PD. Temperature-dependent modulation of *Porphyromonas gingivalis* lipid A structure and interaction with the innate host defenses. *Infect Immun*. 2011 ;79:1187-93.
24. Tsai, CM and Frasch, CE. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem*. 1982; 119, 115–119.
25. Hase S, Hofstad T, Rietschel E T. Chemical structure of the lipid A component of lipopolysaccharides from *Fusobacterium nucleatum*. *J. Bacteriol* 1977; 129: 9 –14.
26. Asai Y, Makimura Y, Kawabata A, Ogawa T. Soluble CD14 discriminates slight structural changes in lipid A that lead to distinct host cell activation. *J Immunol* 2007; 179:7674-7683.
27. Lanna MA, Ribeiro Sobrinho AP, Stehling R et al. Microorganisms isolated from root canals presenting necrotic pulp and their drug susceptibility in vitro. *Oral Microbiol Immunol* 2001;16: 100-105.
28. Teuber K, Schiller J, Fuchs B, Karas M, Jaskolla TW. Significant sensitivity improvements by matrix optimization: a MALDI-TOF mass spectrometric study of lipids from hen egg yolk. *Chem Phys Lipids*. 2010;163:552-60.
29. Cho YT, Su H, Huang TL, Chen HC, Wu WJ, Wu PC, Wu DC, Shiea J. Matrix-assisted laser desorption ionization/time-of-flight mass spectrometry for clinical diagnosis. *Clin Chim Acta*. 2013;415:266-75.

30. Chevallet M, Diemer H, Luche S, van Dorsselaer A, Rabilloud T, Leize-Wagner E. Improved mass spectrometry compatibility is afforded by ammoniacal silver staining. *Proteomics*. 2006;6:2350-4.
31. Chevallet M, Luche S, Rabilloud T. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Nat Protoc*. 2006;1:1852-8.
32. Kumar Y, Lohar J, Bhat S, Bhati M, Gandhi A, Mehta A. Comparative evaluation of demineralization of radicular dentin with 17% ethylenediaminetetraacetic acid, 10% citric acid, and MTAD at different time intervals: An in vitro study. *J Int Soc Prev Community Dent*. 2016;6:44-8.
33. Zehnder M. Root canal irrigants. *J Endod*. 2006;32:389-98. Review
34. Türkün M, Cengiz T. The effects of sodium hypochlorite and calcium hydroxide on tissue dissolution and root canal cleanliness. *Int Endod J*. 1997;30:335-4.
35. Clarkson RM, Moule AJ, Podlich H, Kellaway R, Macfarlane R, Lewis D, Rowell J. Dissolution of porcine incisor pulps in sodium hypochlorite solutions of varying compositions and concentrations. *Aust Dent J*. 2006;51:245-51.
36. Paredes-Vieyra J, Enriquez FJ. Success rate of single- versus two-visit root canal treatment of teeth with apical periodontitis: a randomized controlled trial. *J Endod*. 2012;38:1164-9.
37. Gomes BP, Vianna ME, Zaia AA, Almeida JF, Souza-Filho FJ, Ferraz CC. Chlorhexidine in endodontics. *Braz Dent J*. 2013;24:89-102.
38. Ozdemir HO, Buzoglu HD, Calt S, Cehreli ZC, Varol E, Temel A. Chemical and ultramorphologic effects of ethylenediaminetetraacetic acid and sodium hypochlorite in young and old root canal dentin. *J Endod* 2012;38:204-8
39. Safavi KE, Nichols FC. Effect of calcium hydroxide on bacterial lipopolysaccharide. *J Endod*. 1993;19:76-8.
40. Leive L. The barrier function of the gram-negative envelope. *Ann N Y Acad Sci*. 1974;235:109-29.

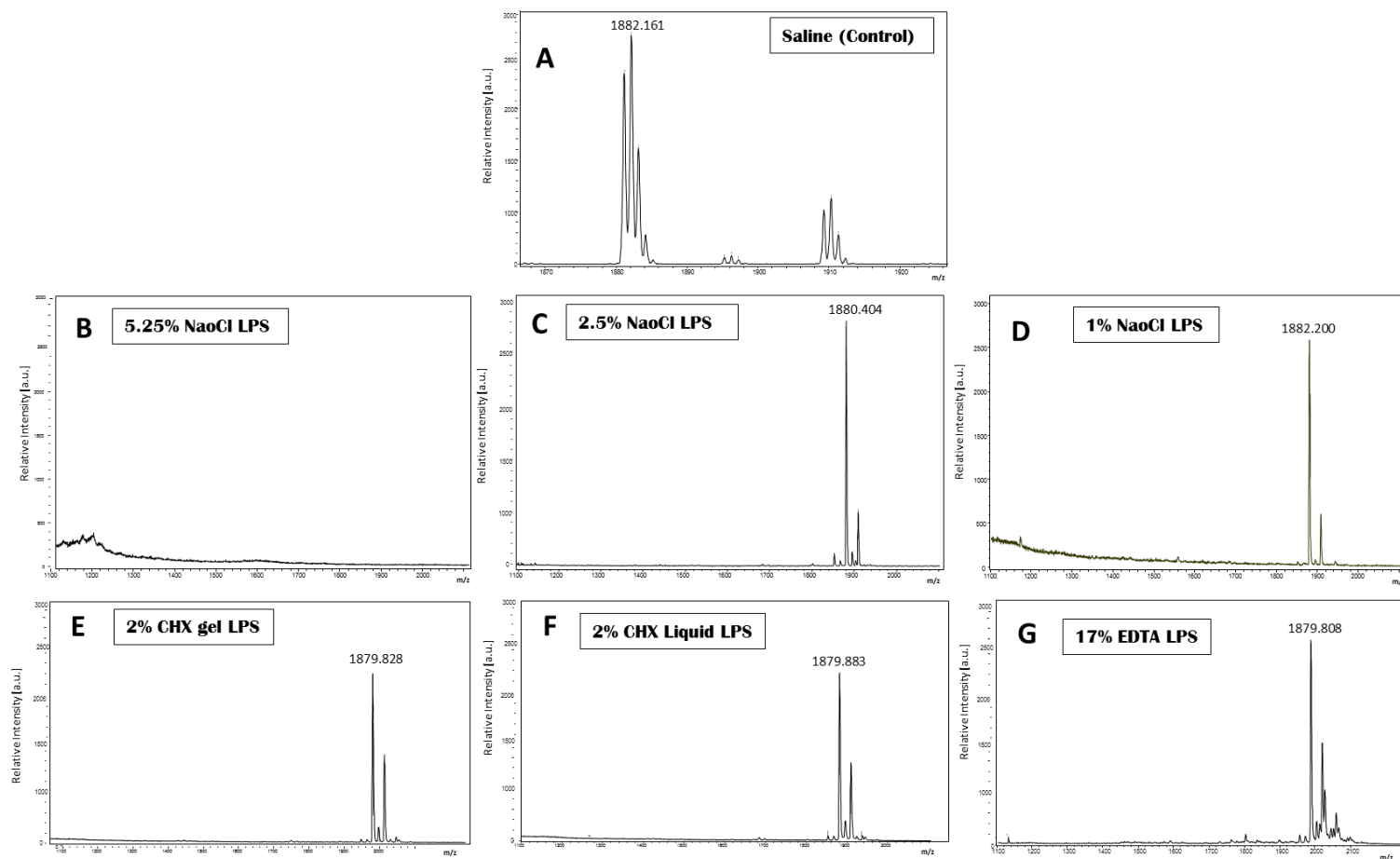


FIGURE 1. Structural analysis of lipid A by Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) after treatment with auxiliary chemical substances of endodontic therapy. *F. nucleatum* LPS (control-saline treatment) demonstrated a predominant ion cluster at m/z 1882. 5.25% NaOCl treated LPS showed absence of lipid A spectral peaks. 2.5% and 1% NaOCl, 2% CHX either gel or solution and 17% EDTA lipid As were detected similar to control.

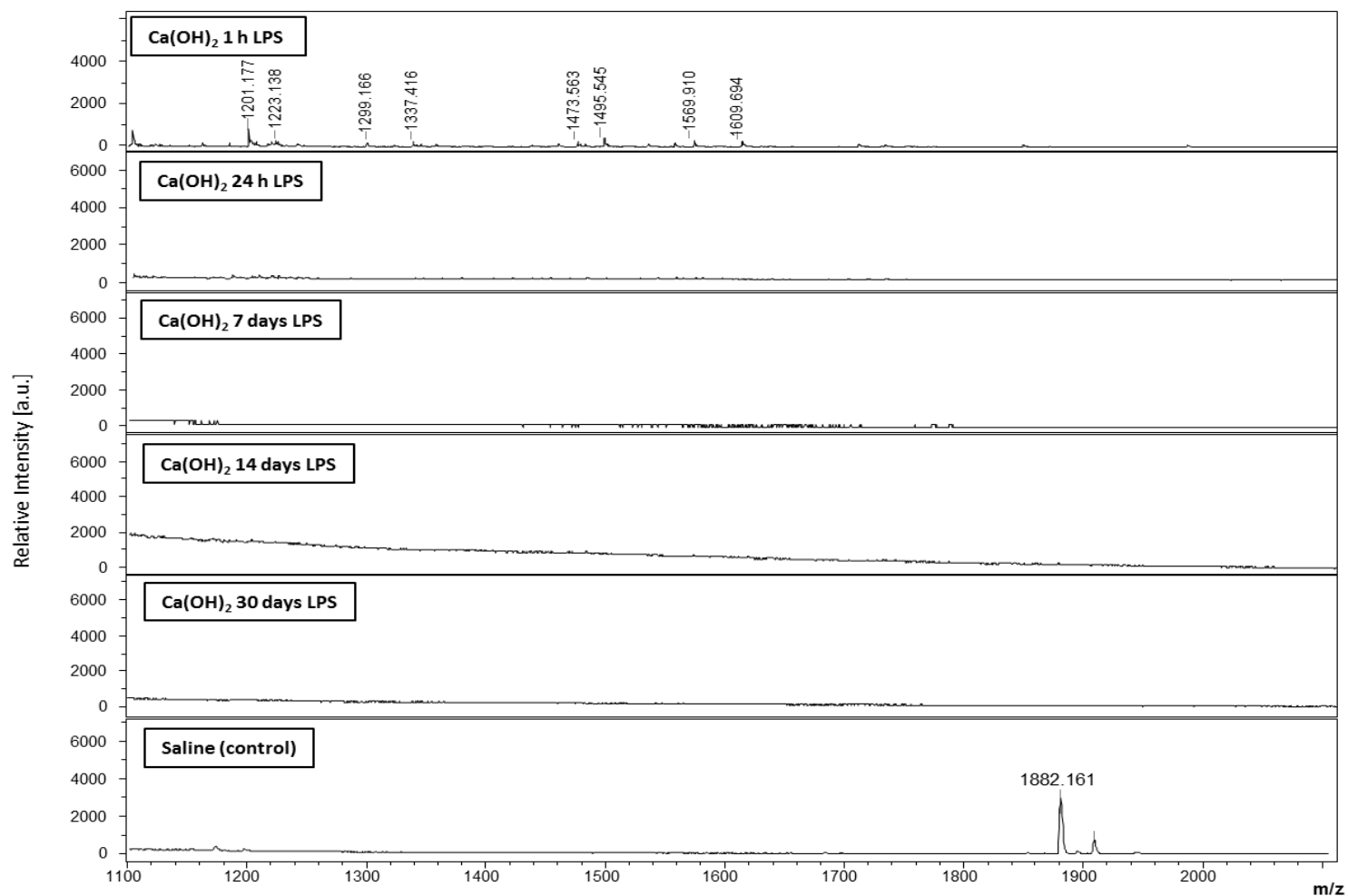


FIGURE 2. Structural analysis of lipid A by MALDI-TOF MS after dressings with calcium hydroxide for 1h, 24h, 7days, 14 days and 30 days. No negatively charged lipid A fragments could be detected by the mass spectrometer with samples treated by Ca(OH)₂ paste from 24h onwards.

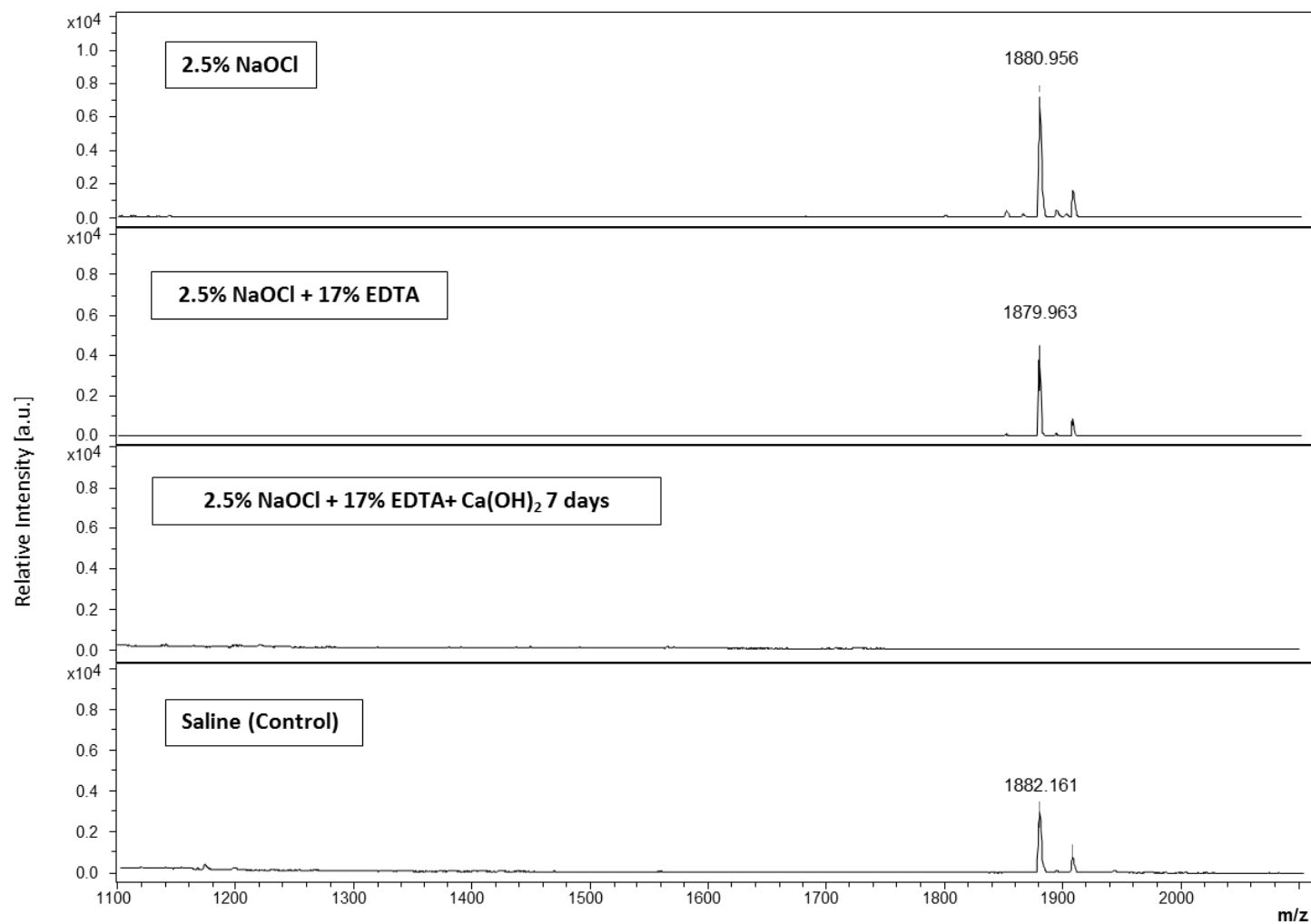


FIGURE 3. Structural analysis of lipid A by MALDI-TOF MS after treatment with association of substances. 2.5% NaOCl protocol. Incorporation of $\text{Ca}(\text{OH})_2$ for 7 days to the bacterial pellet treated with 2.5% NaOCl + EDTA led to the absence of lipid A spectral peaks.

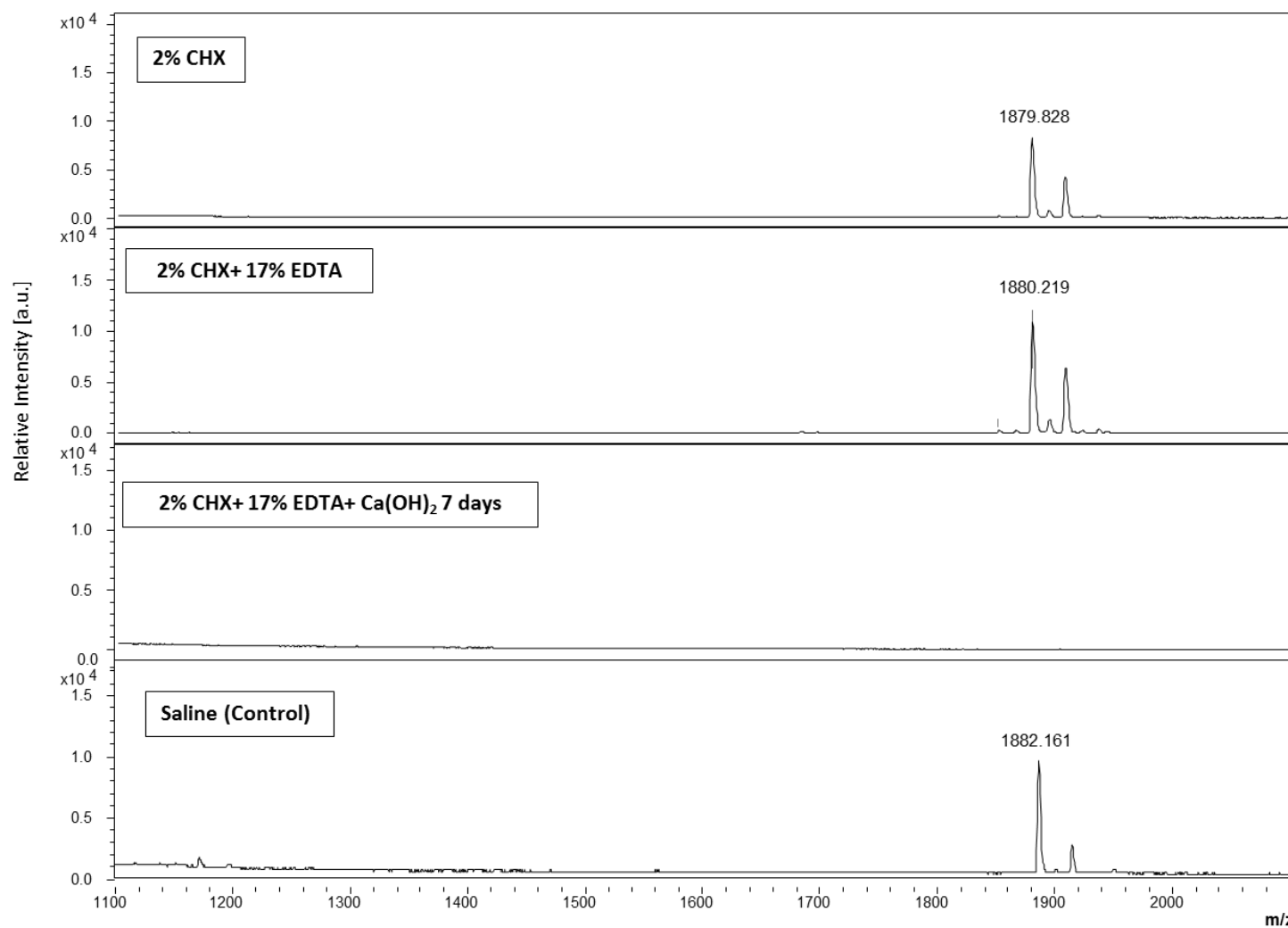


FIGURE 4. Structural analysis of lipid A by MALDI-TOF MS after treatment with association of substances. 2% CHX protocol. After addition of Ca(OH)₂ for 7 days to bacterial pellet treated with 2% CHX and 17% EDTA, lipid A peaks were not detected by the espectometer.

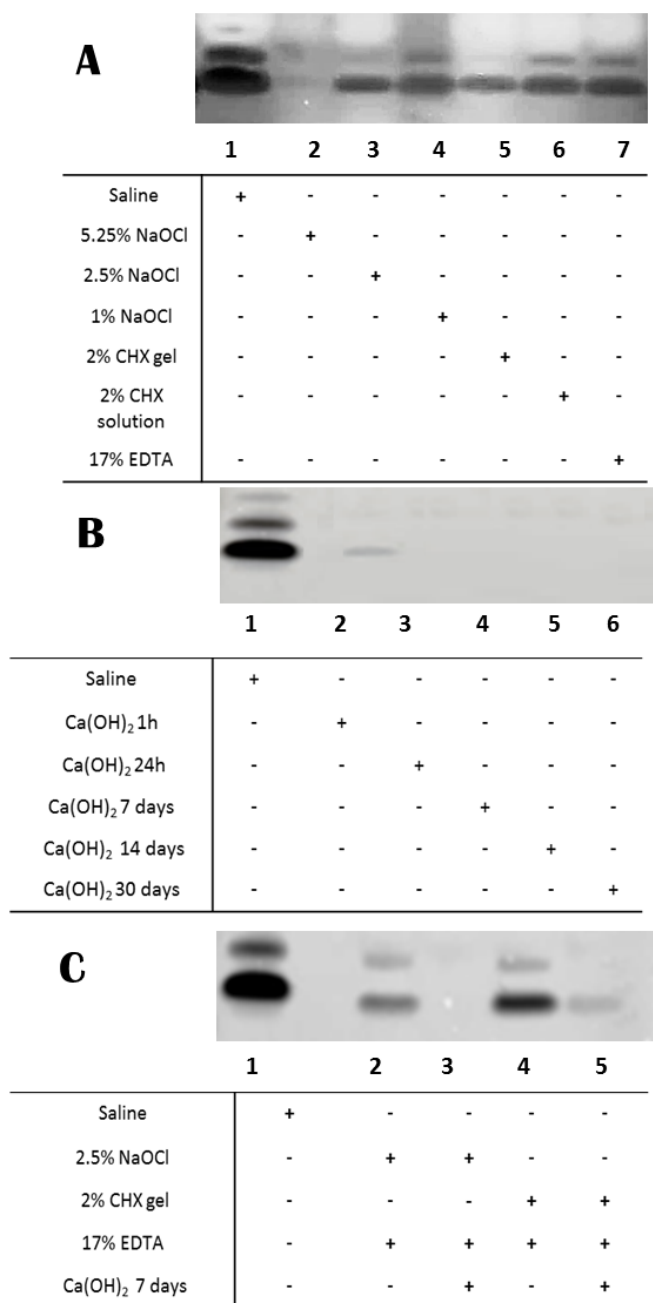


Figure 5. SDS-PAGE electrophoresis followed by silver staining. A- LPS treated with Auxiliary chemical substances; B- LPS treated with Calcium Hydroxide Dressings; No band was detected in the samples corresponding to 5.25% NaOCl treatment and to calcium hydroxide treatment from 24 hs to 30 days. C-. LPS treated with combination of substances. The combination of the alkali treatment for 7 days to bacterial pellet treated either with 2.5% NaOCl or 2%CHX - both followed by EDTA showed an absence of bands after silver staining.

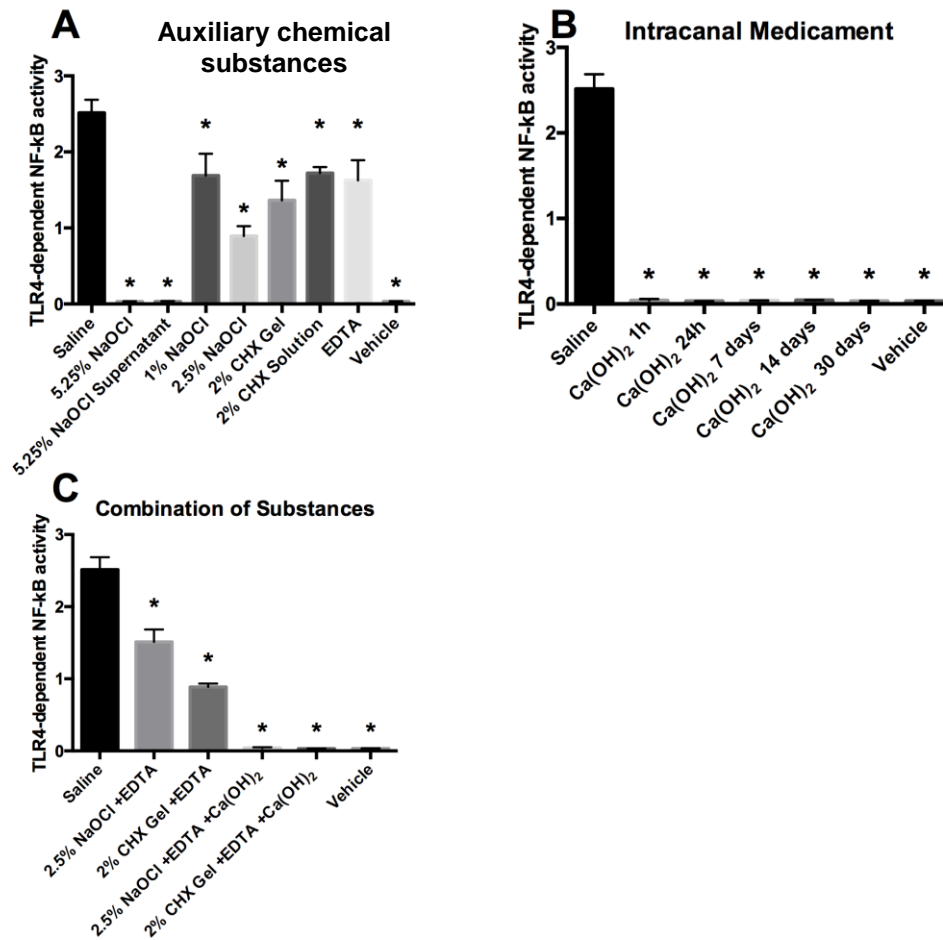


Figure 6. TLR4 Activation in response to different treatment of LPS. A- Auxiliary chemical substances of Endodontic therapy; B- calcium hydroxide dressings; C- Association of substances. LPS from cells treated with saline displayed a more potent TLR4 activation than those treated by other experimental substances. 5.25% NaOCl treated LPS displayed the lower potent TLR4 response. For calcium hydroxide paste, there was no significant difference in HEK cell activation among the different periods of contact tested ($p > 0.05$). A significant decrease in activation was shown when calcium hydroxide paste was added in the combination of substances, either using 2.5% NaOCl or 2% CHX ($p \leq 0.0001$).

3 DISCUSSÃO

3.1 Justificativa da pesquisa

A presente pesquisa foi submetida ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba-UNICAMP, cujos certificados de aprovações encontram-se no Anexo I e II.

A literatura endodôntica revela que a infecção endodôntica primária é causada predominantemente por microrganismos Gram-negativos anaérobios estritos envolvidos com sintomatologia clínica (Griffie *et al.*, 1980; Yoshida *et al.*, 1987; Gomes *et al.*, 1994, 1996; Baumgartner *et al.*, 1999; Siqueira *et al.*, 2001, Jacinto *et al.*, 2003; Siqueira *et al.*, 2004; Sakamoto *et al.*, 2006; Martinho *et al.*, 2010; Montagner *et al.*, 2010). Endotoxinas são consideradas um dos principais mediadores imunológicos presentes nos casos de periodontite apical. Esta molécula consiste em um complexo de lipopolissacarídeos, integrantes da membrana externa da parede celular de bactérias Gram-negativas (Dixon & Darveau *et al.*, 2005).

Ao longo dos últimos 100 anos, endotoxina bacteriana é considerada uma das moléculas mais potentes e de maior interesse encontrada na natureza (Petsch & Anspach, 2000). Suas peculiaridades estruturais, diversidade química e física e seu amplo espectro de atividade biológica resultaram em uma das linhas de pesquisa mais fomentadas mundialmente. Ainda que sua composição química

e estrutural tenha sido amplamente explorada (Raetz, 1990), perguntas surgem quanto ao real papel das endotoxinas nas infecções humanas (Petsch & Anspach, 2000).

Para melhor conhecimento da atividade endotóxica das bactérias orais, estudos têm sido realizados com enfoque na linha de extração do LPS e estimulação celular (Horiba *et al.*, 1989; Hosoya *et al.*, 1997; Hong *et al.*, 2004) para permitir um maior entendimento da resposta celular, principalmente sobre os macrófagos (primeiras células de defesa do hospedeiro a desencadear o processo inflamatório).

Como se sabe, a bioatividade da endotoxina acarreta em liberação de mediadores inflamatórios (TNF-alfa, IL-1, IL-6 e IL-8), o que gera um processo de reabsorção óssea (Hong *et al.*, 2004; (Leonardo *et al.*, 2004; Maekawa *et al.*, 2011; Endo *et al.*, 2012), atrasando o processo do reparo periapical pós-tratamento endodôntico.

O tratamento endodôntico é realizado, em sua grande maioria, para impedir que a infecção se espalhe dos canais radiculares para os tecidos perirradiculares. Desta forma, a máxima que norteia a Endodontia atual é a busca por um protocolo de tratamento que permita reduzir ao máximo a carga de microbiana e de endotoxinas e restabelecer um ambiente favorável ao reparo perirradicular (Barthel *et al.*, 1997, Vianna *et al.*, 2007, Marinho *et al.*, 2014, Grundling *et al.*, 2015).

O presente estudo utilizou de métodos de detecção/quantificação microbiana e de endotoxinas, de manobras endodônticas contemporâneas (técnicas e substâncias específicas), visando alcançar uma máxima redução do conteúdo microbiano/endotóxico. Também monitorou o potencial inflamatório deste conteúdo presente nos canais radiculares durante todas as fases do tratamento endodôntico, através da produção de citocinas pró-inflamatórias. Isto é importante na adoção de um protocolo de tratamento efetivo, baseado em resultados biológicos e clínicos.

Um ponto original do trabalho foi a investigação do papel das diferentes substâncias químicas auxiliares, da medicação intracanal à base de hidróxido de cálcio e da associação de ambas sobre o LPS, buscando sua degradação/neutralização e conseqüentemente, menor potencial inflamatório aos tecidos perirradiculares. Isto foi realizado tanto clinicamente como no laboratório, visando observar as alterações estruturais e na bioatividade do LPS causadas por substâncias utilizadas na terapia endodôntica. Este trabalho foi inédito na Endodontia, fornecendo resultados importantes para o protocolo adotado nas condutas clínicas, validando o que melhor se aplica para neutralização do LPS presente em infecções, e servindo de diretrizes para futuros estudos.

Outra contribuição inédita da pesquisa foi a validação do método LAL utilizando na detecção/quantificação de endotoxinas. Sabe-se que os canais radiculares podem conter exsudatos com colorações diferentes (i.e. hemorrágico, purulento, claro, etc), assim como existem diferentes formulações de substâncias

químicas auxiliares e medicações intracanaís. Desta forma era importantíssimo verificar se o método de LAL não sofre interferência na presença de substâncias químicas auxiliares, medicações intracanaís e nas diferentes condições clínicas dos canais radiculares.

Todos os dados obtidos permitiram uma correlação entre resultados laboratoriais e os aspectos clínicos do pacientes. Os resultados apontaram para a necessidade da instituição de uma terapia endodôntica contemporânea mais eficaz, baseada em princípios de erradicação da infecção, tanto no aspecto microbiológico como no de endotoxinas.

3.2 Validação do método de quantificação de endotoxinas em contato com substâncias químicas utilizadas na terapia endodôntica

No artigo 1 foi utilizado inóculo bacteriano *Escherichia coli* ATCC 25922. Mesmo que *Escherichia coli* não seja comumente encontrada em canais radiculares com necrose pulpar, sua endotoxina apresenta a estrutura básica do componente lipídico, que representa o centro ativo responsável pela toxicidade do LPS. Dada a sua elevada toxicidade, estudos têm sugerido a sua utilização para avaliar a influência de substâncias químicas na leitura do teste de quantificação de endotoxinas e a efetividade destas substâncias na degradação da molécula de endotoxina (Oliveira *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, 2007; Signoretti *et al.*, 2011, Grundling *et al.*, 2015, Melo *et al.*, 2016).

Estudos como o de Signoretti *et al.* (2011), Marinho *et al.* (2012), Grundling *et al.* (2015), Melo *et al.* (2016) também utilizaram em seus experimentos o sorotipo (O55:B5) de LPS, proveniente dessa mesma espécie microbiana. Além disso, a endotoxina de *Escherichia coli* (O55:B5) utilizada é de fácil aquisição e possibilita a padronização da contaminação das amostras.

Conhecido por detectar endotoxinas, mesmo em baixas concentrações, o método “*Limulus Amebocyte Lysate*” (LAL) é um dos mais sensíveis métodos empregados (Novitsky, 1985). Foi demonstrado por Martinho *et al.* (2010) que os testes quantitativos cinéticos de detecção são mais precisos e reprodutíveis para quantificação de endotoxinas em canais radiculares. Diante disto, o teste cinético turbidimétrico (Pyrogent 5000[®]) foi o teste de escolha deste estudo para quantificar endotoxinas, no qual a amostra foi colocada em um fotômetro e monitorada automaticamente até o desenvolvimento de turbidez.

Adicionalmente, foi constatado no presente estudo que características de desempenho do ensaio cinético turbidimétrico para quantificação de endotoxinas, tais como precisão e reprodutibilidade são moduladas pela interação do substrato de LAL com diferentes substâncias utilizadas na terapia endodôntica.

Um aspecto importante do nosso estudo foi a validação de uso das substâncias químicas auxiliares comumente testadas para redução de endotoxinas e portanto, caracterizadas como “não-interferentes” na reação do substrato de LAL e endotoxinas presente na amostra. Em contrapartida, substâncias que se apresentam turvas na forma final de uso, tais como água

oxigenada, polimixina B e pasta tripla antibiótica podem influenciar negativamente na mensuração dos níveis de endotoxinas, gerando resultados que podem, inclusive, não ser validados pelo teste cinético turbidimétrico.

Todas as substâncias químicas auxiliares no presente estudo foram manipuladas pela Drogal Farmácia de Manipulação Ltda (Piracicaba, SP) em pequenas porções, 24 horas antes da intervenção endodôntica. A clorexidina gel (Endogel; Itapetininga, SP, Brasil) utilizada no presente estudo consistiu de base de gel natrosol 1% e gluconato de clorexidina 2% pH 7,0.

3.3. Detecção de microrganismos nas infecções endodônticas primárias pelo método de PCR 16S rDNA

A técnica utilizada para realização das coletas microbiológicas foi descrita previamente em detalhes por Gomes *et al.* (1994; 1996; 2006) e detalhada no Apêndice I.

Aplicado para amostras pequenas, como as coletadas por pontas de papel absorvente, foi utilizado o meio de transporte VMGAI (Viability Medium Göteborg Agar) para coletas microbiológicas antes (artigos 2 e 3) e após o preparo do canal radicular (artigo 3). Este meio de transporte microbiológico foi descrito inicialmente por Dahlén *et al.* (1993) e é preparado para suportar microrganismos anaeróbios estritos e facultativos sem favorecer crescimento microbiano.

Considerando que os diferentes patógenos Gram-negativos investigados no presente estudo são de difícil cultivo microbiano, optou-se por realizar a identificação microbiológica através de métodos moleculares, elevando as chances de detecção (Gomes *et al.*, 2007; Montagner *et al.*, 2010). Desta forma, a seleção de microrganismos foi realizada com base na frequência de detecção das espécies em infecções endodônticas primárias.

Neste estudo, foram investigadas espécies bacterianas frequentemente encontradas em canais radiculares com infecção endodôntica primária em amostras obtidas de 30 dentes com diagnóstico de necrose pulpar e lesão periapical visível radiograficamente, comprovados através de exames clínicos e radiográficos.

Baseado em trabalhos na literatura que investigaram microbiologicamente o conteúdo endodôntico, a anti-sepsia do campo operatório previamente à abertura coronária foi realizada com peróxido de hidrogênio 30%, seguido da solução de hipoclorito de sódio 2,5% por 30 segundos cada e, por fim, neutralização da solução de hipoclorito de sódio com solução de tiosulfato de sódio 5% estéril (Gomes *et al.*, 2004; Jacinto *et al.*, 2005; Jacinto *et al.*, 2006; Vianna *et al.*, 2007; Gomes *et al.*, 2009; Martinho *et al.*, 2010; Montagner *et al.*, 2010). A esterilidade do campo operatório após o protocolo de desinfecção foi confirmada por coletas da coroa dental antes da abertura coronária. Todos os testes resultaram em culturas negativas destas amostras, evidenciando assim que não havia contaminação microbiológica da coroa. A técnica utilizada para realizar

a coleta dos microrganismos neste estudo foi descrita previamente em detalhes por Gomes *et al.* 1994 e 1996.

No presente trabalho, microrganismos foram identificados em 100% dos casos nos canais radiculares analisados. A frequência do número de espécies por canal radicular variou entre 1 e 5, estando em média 2 espécies investigadas por canal, o que sustenta a afirmação de que as infecções endodônticas primárias são polimicrobianas (Gomes *et al.*, 1994, 1996; Jacinto *et al.*, 2003; Siqueira *et al.*, 2005; Vianna *et al.*, 2007., Sassone *et al.*, 2012).

Os bacilos produtores de pigmento negro foram detectados em 76,6% dos casos, em concordância com os trabalhos de Rôças *et al.*, 2003 Foschi *et al.*, 2005; Gomes *et al.*, 2006; Tomazinho & Ávila-Campos, 2006. Com maior incidência, *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis* seguida de *Prevotella nigrescens*. Semelhantemente, Tomazinho & Ávila-Campos (2006) detectaram por PCR a presença de *P. gingivalis*, *P. endodontalis*, *P. intermedia* e *P. nigrescens* em 60% das amostras coletadas de canais radiculares com infecção endodôntica primária. Estes achados corroboram que bacilos produtores de pigmento negro parecem ser freqüentes em dentes com necrose pulpar.

3.4 Lipopolissacarídeo e seu potencial inflamatório

Lipopolissacarídeos são constituintes hidrofóbicos presentes na membrana externa de bactérias Gram-negativas. Aproximadamente 75% da superfície celular bacteriana é composta por esta molécula (Caroff & Karibian,

2003), sendo essencial para o crescimento celular, diminuição da permeabilidade da membrana, confere ainda integridade e estabilidade estrutural, assim como proteção contra agressões externas (Rietschel, 1992).

Endotoxinas são liberadas da membrana externa durante a replicação ou morte da bactéria, devido à lise da parede celular (Rietschel, 1992). Uma vez no meio circulante, não causam danos teciduais de forma direta, e sim, estimulam células competentes na produção de mediadores químicos. Sua atividade biológica é decorrente de sua ligação a diferentes proteínas séricas circulantes, as LBPs- (LPS binding proteins). Essas proteínas se ligam à porção do lípide A das endotoxinas e rapidamente catalisam sua transferência para o receptor CD14 presente na membrana celular de macrófagos. A ativação de macrófagos pelo complexo LPS-CD14 inicia o processo de sinalização para receptores chamados TLR- (Toll-like receptor), induzindo ativação celular. Esses receptores reconhecem o LPS bacteriano como estranho ao hospedeiro, de forma única e específica para cada bactéria.

Sabe-se que há mais de dez diferentes tipos de TL receptores e alguns deles estão envolvidos no reconhecimento de compostos bacterianos. O TLR4 é o que participa desse processo, respondendo à presença do LPS. O TLR4 faz com que macrófagos sintetizem mediadores químicos, tais como citocinas. Neste processo há produção de interleucina-1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6), interleucina-8 (IL-8), fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), bem como liberação de radicais reativos do oxigênio e do nitrogênio e mediadores lipídicos, ativação do sistema

complemento, ativação do metabolismo do ácido aracdônico produzindo prostaglandinas e leucotrienos, ativação do Fator de Hageman (Fator XII de coagulação), este por sua vez, induz à produção de bradicinina, potencializando a sensação dolorosa na área afetada, e ativação da resposta imunológica humoral e diferenciação de osteoclastos e reabsorção óssea (Safavi & Nichols, 1993).

De acordo com os resultados deste estudo, endotoxinas foram detectadas em 100% das amostras coletadas de canais radiculares (mediana=32.43 EU/mL), corroborando com o trabalho de Jacinto *et al.*, 2005, Martinho *et al.* 2010, Martinho *et al.*, 2011; Gomes *et al.*, 2012, Oliveira *et al.*, 2012, Marinho *et al.*, 2014). Considerando que todos os casos selecionados não apresentavam dor espontânea, acredita-se que deve ser atingido um limiar de concentração de endotoxinas sobre os tecidos pulpare e perirradiculares para o desencadeamento de manifestação clínica dolorosa.

3.5 Ação física da substância química auxiliar nos níveis de endotoxinas na presença de fluxo-refluxo

Neste estudo, foram comparadas duas substâncias químicas auxiliares mais comumente utilizadas em Endodontia - NaOCl 2,5% e CLX 2%, na remoção de endotoxinas de canais radiculares com necrose pulpar e presença de lesão periapical associada. Embora bem consolidado o uso dessas substâncias químicas auxiliares na terapia endodôntica, por sua ação antimicrobiana de amplo espectro (Martinho & Gomes, 2008; Gomes *et al.*, 2009, Marinho *et al.*, 2014,

Rôças *et al.*, 2016), é necessário também investigar sua ação detoxificante sobre endotoxinas em canais radiculares infectados.

Nos artigos 2 e 4, observou-se que os níveis iniciais de endotoxinas foram significativamente reduzidos após a instrumentação, independente da substância química auxiliar utilizada. A expressiva redução de endotoxina alcançada quando se utilizou soro fisiológico reafirmou o papel desempenhado pela ação mecânica dos instrumentos endodônticos, particularmente de limas rotatórias na completa extensão do canal radicular, conjuntamente com o fluxo e refluxo da solução irrigadora na redução dos níveis de endotoxinas.

Avaliando o desempenho individual de cada substância química auxiliar após a instrumentação do canal radicular, foi observado um maior percentual de redução de endotoxinas pelo grupo do NaOCl 2,5% quando comparado à clorexidina gel 2%. Considerando que o mesmo volume de irrigante foi utilizado em todos os grupos (5mL a cada troca de lima), no grupo da CLX gel 2% a irrigação deveria remover raspas de dentina infectada imersas em gel, o que dificulta o turbilhonamento da solução irrigadora, sugerindo a necessidade de um volume maior de soro fisiológico para uma limpeza mais eficaz.

Na prática clínica, o EDTA 17% é usado para remoção da *smear layer* (Torabinejad *et al.*, 2003), independente da substância química auxiliar utilizada. A camada de *smear layer* produzida durante o preparo do canal radicular pode promover adesão e colonização de bactérias, dentre elas, as Gram-negativas, à matriz dentinária. Portanto, seu uso é essencial no protocolo de desinfecção do

canal radicular (Martinho *et al.*, 2010). Considerando o fato do LPS se aderir a tecidos mineralizados (Schein & Schilder, 2006), julga-se importante a utilização de um agente quelante para potencializar a redução de LPS do interior de canais radiculares após a instrumentação.

Após o toailete final com EDTA 17%, não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos. Estes achados demonstram a contribuição do EDTA 17% (3mL- 3 minutos, com renovação a cada minuto), no protocolo de redução de endotoxinas de canais radiculares infectados, sendo seu uso preconizado independente da substância química auxiliar utilizada.

O EDTA age em camadas mais profundas ($\approx 130 \mu\text{m}$) da dentina infectada não atingidas pelo preparo químico-mecânico (Berutti *et al.*, 1997). Além disso, é um forte agente quelante (Petsch & Anspach, 2000) que pode reagir com o Ca^{++} presente no lipídeo A do LPS (Burton & Carter, 1964), afetando a estrutura dessa molécula.

Vale ressaltar que, independente da substância química auxiliar utilizada, endotoxina ainda foi detectada mesmo após o toailete final do canal radicular com EDTA 17%. Assim, permaneceu uma quantidade residual de endotoxinas nos canais radiculares. Não há dados na literatura acerca dos níveis residuais de endotoxinas que favoreça ou não a perpetuação da lesão periapical.

3.6 Ação química da medicação intracanal à base de hidróxido de cálcio na quantificação dos níveis de endotoxinas

Embora uma redução considerável nos níveis de endotoxinas foi obtida pelos efeitos químico-mecânicos da instrumentação e da irrigação, nenhum protocolo testado antimicrobio foi capaz de eliminar o conteúdo endotóxico de canais radiculares infectados.

Enquanto menores irregularidades anatômicas possam ser incorporadas no preparo, áreas como reentrâncias, istmos, ramificações laterais e apicais e túbulos dentinários podem abrigar bactérias e endotoxinas que, uma vez não eliminadas, põem o resultado do tratamento em risco. Estas áreas não são comumente afetadas por instrumentos e a substância química auxiliar empregada na irrigação não terá tempo de ação intracanal suficiente para agir em profundidade.

No presente trabalho, foi evidenciado que o hidróxido de cálcio associado ao soro fisiológico potencializa a redução de endotoxinas alcançada pelo preparo químico-mecânico. A medicação permaneceu por 30 dias no interior dos canais radiculares. Por permanecer por tempo prolongado no interior do canal radicular, o hidróxido de cálcio tem maiores chances de atingir áreas não afetadas pela instrumentação do canal e assim, contribui decisivamente para a máxima redução LPS.

O hidróxido de cálcio é uma base forte, capaz de desnaturar proteínas, dissolver material necrótico, liberar íons hidroxila alcalinizando o meio, causar

hidrólise de lipopolissacarídeos bacterianos, competir com as bactérias anaeróbias na utilização do CO₂ ambiente, e induzir a mineralização dos tecidos apicais devido à liberação de íons de cálcio (Buck, *et al.*, 2001).

Devido suas características físicas, um pó, a sua inserção no interior do canal torna-se difícil, daí a necessidade de adição de um veículo, que crie as condições para o preenchimento do canal, sem interferir nas propriedades físico-químicas. Este veículo deve favorecer a dissociação, para que haja a liberação de íons de Ca⁺⁺ e hidroxila (Buck *et al.*, 2001).

Um achado clínico importante obtido neste trabalho foram os dados relacionados ao reparo do canal radicular após o uso da medicação intracanal. Após re-instrumentação do canal radicular e lavagem final com EDTA quantidades mínimas de LPS permaneceram no interior do canal radicular, demonstrando a importância de reinstrumentar o canal após o uso de uma medicação. É importante ressaltar que a concentração de LPS antes da obturação do canal radicular pode influenciar o prognóstico (Gomes *et al.*, 2009).

3.7 Avaliação do potencial inflamatório do conteúdo endodôntico - Estimulação celular e dosagem de citocinas inflamatórias

Outro fato que merece destaque foi a avaliação da antigenicidade do conteúdo infeccioso (i.e. microrganismos + endotoxinas) presente nos canais radiculares contra macrófagos na produção de citocinas pró-inflamatórias. O presente estudo utilizou macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7. O

macrófago é considerado o principal responsável pela resposta imunológica devido a sua capacidade de síntese, de fagocitose e processamento antigênico. Além disso, estão presentes em maior população no tecido periapical, os quais são considerados a principal fonte de produção de citocinas inflamatórias (Artese *et al.*, 1991; Matsuo *et al.*, 1992; Metzger, 2000), e quase exclusivamente o produtor de TNF- α na presença de LPS bacteriano (Beutler & Cerami, 1986).

Devido a sua fácil obtenção, importância no processo inflamatório e de reparo, e elevada presença no peritônio, optamos pela escolha dos macrófagos peritoneais de camundongos como células alvo para análise da reação a estímulos. Além disso, macrófagos têm sido utilizados em testes de imunotoxicidade por permitir a dosagem de citocinas produzidas em cultura de células e pela habilidade em manter suas funções imunológicas na presença de diferentes agentes químicos (Barile *et al.*, 1994).

Atualmente, existem diversos métodos para quantificar citocinas pró-inflamatórias em amostras clínicas. A utilização do método ELISA neste trabalho deveu-se, principalmente, por sua alta sensibilidade e especificidade, com alto grau de confiabilidade como ensaio quantitativo, destacando-se o ELISA Sanduíche. Neste método, o anticorpo de um antígeno particular é, inicialmente, adsorvido no poço de uma placa de cultura de células. Após, o antígeno é adicionado e se liga ao anticorpo. Finalmente, um segundo e diferente anticorpo ligado a uma enzima é adicionado. Este complexo tem como função a conversão de um cromógeno incolor num produto final que pode conferir diversas cores aos

anticorpos marcados. Nesse caso, a intensidade da reação é proporcional à quantidade de antígeno presente. Logo, permite mensurar até pequenas quantidades de antígeno.

Devido a agressão, estímulo ou stress causados por bactérias e seus subprodutos, as células sofrem alterações morfológicas, degeneração ou morte celular. A liberação de mediadores químicos reflete a citotoxicidade de componentes bacterianos (LPS), como também a efetividade de substâncias químicas na neutralização destes produtos tóxicos.

Estudos mostram que o grau de ativação de monócitos depende da virulência do LPS, sendo esta virulência específica para determinadas espécies bacterianas, principalmente as Gram-negativas (Dixon & Darveau, 2005).

Por meio do presente trabalho foi possível determinar quão pró-inflamatório é o conteúdo endodôntico de dentes com infecção endodôntica primária, monitorando sua bioatividade após cada etapa subsequente do tratamento endodôntico. O presente estudo utilizou diretamente o conteúdo infeccioso coletado individualmente dos 30 canais radiculares na etapa de estimulação celular, correlacionando níveis de endotoxinas com citocinas pró-inflamatórias.

Foi investigada a produção de IL-1 β e TNF- α , uma vez que são citocinas comumente relacionadas à progressão da inflamação pulpar e perirradicular (Artese *et al.*, 1991; Hosoya *et al.*, 1997).

São atribuídas funções específicas para cada citocina produzida no desenvolvimento da periodontite apical, cujos efeitos de suas interações repercutem na presença de sinais/sintomas e achados radiográficos.

Produção de IL1- β e TNF- α nos sobrenadantes foi detectada em 100% dos casos estimulados com conteúdo endodôntico inicial, corroborando com os achados de Martinho *et al.*, 2010; Martinho *et al.*, 2012 e Oliveira *et al.*, 2012. Foi observada produção de TNF- α em maiores concentrações do que IL1- β ($p < 0,05$), corroborando com os achados de Maekawa *et al.* (2011).

Estudos sugerem que IL- 1β , isoladamente, não é responsável pela progressão da lesão. Estudos recentes demonstram que nos sítios de inflamação existe um complexo “*network*” entre as diferentes citocinas produzidas, o que permite a comunicação entre diferentes células envolvidas no processo inflamatório na potencialização de um efeito biológico (Martinho *et al.*, 2012).

Correlação positiva foi encontrada entre os níveis iniciais de IL-1 β e TNF- α . Trabalhos na literatura têm mostrado que essas citocinas estão presentes em níveis significantes em tecidos periapicais de humanos e de modelos experimentais em animais (Barthel *et al.*, 1997; Pezelj-Ribaric *et al.*, 2007).

Por um estímulo LPS-induzido e dose-dependente, IL1- β promove migração de neutrófilos para o sítio da infecção, e desta forma, exerce importante contribuição à resposta inflamatória na presença de bactérias Gram-negativas. Por sua vez, TNF- α estimula a síntese de prostaglandinas e proteases por diferentes

tipos celulares, incluindo fibroblastos e osteoblastos (Prso *et al.*, 2007; Pezelj-Ribaric *et al.*, 2007).

O potencial inflamatório do conteúdo endodôntico foi monitorado antes e após a instrumentação do canal radicular, comparando a efetividade das diferentes substâncias químicas auxiliares, após o uso do EDTA 17% e após uso da medicação intracanal.

Quanto aos níveis de IL1- β nas diferentes etapas operatórias, os resultados encontrados neste trabalho demonstraram que o conteúdo infeccioso demonstrou maior potencial inflamatório inicialmente, sendo este reduzido após a instrumentação do canal radicular, tanto para as substâncias químicas auxiliares quanto para o soro fisiológico ($p < 0,05$).

Na comparação entre grupos, as substâncias dotadas de atividade antimicrobiana- NaOCl 2,5% e CLX 2% obtiveram melhores resultados quando comparadas ao grupo controle. Embora a clorexidina gel 2% tenha apresentado menor produção de IL1- β quando comparada ao hipoclorito de sódio estas substâncias não diferiram entre si quanto aos níveis de IL1- β . Ainda que reduzindo os níveis de IL1- β , o grupo controle obteve maior produção desta citocina ao final da terapia endodôntica. Este fato reafirma a necessidade do uso de uma substância com propriedades antimicrobianas para uma desinfecção mais efetiva do sistema de canais radiculares.

Quanto aos níveis de TNF- α , a análise do efeito da instrumentação do canal radicular demonstrou uma menor produção desta citocina em todos os

grupos. Quanto ao desempenho individual das substâncias químicas auxiliares na redução dos níveis de TNF- α , o hipoclorito de sódio 2,5% apresentou maior percentual de redução seguido da clorexidina gel 2%, entretanto, estas substâncias não diferiram entre si. Ainda, o hipoclorito de sódio apresentou-se significativamente mais eficaz do que a solução salina, que reduziu em apenas 45,25% os níveis de TNF- α produzidos. Um melhor desempenho de substâncias dotadas de atividade antimicrobiana sugere que sua atividade química parece interferir no potencial inflamatório do LPS, alterando qualitativamente seu potencial inflamatório.

Após o uso do EDTA 17% foi constatada redução significativa dos níveis de TNF- α em todos os grupos, ressaltando a contribuição deste agente quelante na remoção da *smear layer* e potencialização da desinfecção intrarradicular.

Após o uso da medicação intracanal, o potencial inflamatório do conteúdo endodôntico foi significativamente reduzido. Ao entrar em contato com o LPS bacteriano, o hidróxido de cálcio promove sua hidrólise, transformando-o em ácido graxo hidrossolúvel (Leonardo *et al.*, 2004), portanto seu potencial inflamatório quanto à produção de citocinas pró-inflamatórias é consideravelmente diminuído. Após re-preparo do canal radicular, o conteúdo endodôntico se mostrou menos imunoestimulador em cultura de macrófagos, levando a uma menor produção de citocinas pró-inflamatórias antes do momento da obturação.

3.8 Ação mecânica do preparo do canal radicular nos níveis de bactérias e endotoxinas

Quanto à ação mecânica do preparo, Marinho *et al.*, (2012) revelaram que o calibre apical do preparo pode exercer influência significativa no controle da infecção, sendo também benéfica para redução de endotoxinas do interior dos canais radiculares. Tal achado indica que quanto mais amplo for o preparo do canal, maior também será a eliminação de LPS do seu interior. Por outro lado, o diâmetro anatômico inicial do forame apical é o ponto de partida que deve nortear a determinação do diâmetro apical final de preparo (Hecker *et al.*, 2010). Vale ressaltar que a penetração de irrigantes no terço apical do canal radicular e remoção de debris são dependentes do diâmetro apical final do preparo (Baugh, Wallace, 2005). E, portanto, a ação física da irrigação favorece a desinfecção.

De forma original, o artigo 3 demonstrou que a ação de alargamento foraminal associado a uma irrigação copiosa parece ser mais relevante para remoção de bactérias e endotoxinas do que o número de limas empregado durante a instrumentação do canal radicular. O sistema Reciproc apresenta similaridades com sistemas rotatórios quanto à remoção de debris e da camada de *smear layer*, sendo capaz de manter o eixo original de canais curvos durante o preparo biomecânico (Versiani, 2012, Ribeiro *et al.*, 2014).

Os resultados encontrados no artigo 3 podem contribuir para a otimização do tempo clínico do tratamento endodôntico e delineamento experimental de

novos estudos que tem como objetivo a máxima redução de bactérias e LPS de canais radiculares infectados.

3.9 Alteração estrutural do LPS em contato com substâncias químicas auxiliares e hidróxido de cálcio (contato direto)

Os resultados desta pesquisa são pioneiros acerca do efeito químico isolado de substâncias antimicrobianas utilizadas na terapia endodôntica. Vale ressaltar que mudanças no micro-ambiente podem alterar estruturalmente a porção bioativa do LPS, lipídeo A (Al-Qutub *et al.*, 2006). Os resultados deste estudo demonstraram que a integridade estrutural do LPS é comprometida após tratamento com NaOCl 5,25%. Menores concentrações dessa substância (2,5 % e 1%) e demais substâncias químicas auxiliares não induziram nenhuma alteração na massa-carga (m/z) do lipídeo A. Estudos futuros devem ser realizados para investigar se há uma concentração intermediária (2,5% - 5,25%) do NaOCl que seja capaz de hidrolisar o lipídeo A, entretando, com reduzida toxicidade aos tecidos periapicais.

É indiscutível a propriedade de saponificação de lipídeos do NaOCl 5,25% frente à molécula do LPS. Seu elevado potencial de dissolução tecidual e baixa tensão superficial consagraram essa substância como a mais utilizada mundialmente na terapia endodôntica. Em contrapartida, várias complicações têm sido relatadas com o uso do NaOCl durante o tratamento endodôntico, tais como dor severa, desenvolvimento de edema, hematoma e necrose tecidual causado

pelo efeito oxidativo desta substância quando em contato com os tecidos periapicais (Becking, 1991). Sua elevada citotoxicidade, em detrimento de sua concentração, faz repensar seu uso principalmente a depender do protocolo e técnica de instrumentação do canal radicular, particularmente quando é preconizada ampliação foraminal.

Como alternativa ao NaOCl, a clorexidina, como substância química auxiliar, vem ganhando aceitação por parte de muitos profissionais. Baseada em evidências científicas, esta substância apresenta amplo espectro antimicrobiano e substantividade (Vianna *et al.*, 2007). Seu efeito residual não favorece a recolonização bacteriana por mais de 7 dias após a instrumentação (Dametto *et al.*, 2002).

No presente estudo, a clorexidina não induziu nenhuma alteração estrutural na molécula do LPS. É certo que esta substância apresenta a desvantagem de não possuir a capacidade de dissolução de tecido orgânico. Quando a capacidade benéfica de degradação de LPSs é desejada, pode-se dizer que a clorexidina não atende esse requisito.

Entretanto, a clorexidina possui a capacidade de promover a suspensão de restos pulpares, facilitando sua posterior remoção através do ato físico da irrigação-aspiração do canal radicular com soro fisiológico (Ferraz *et al.*, 2001). Aliado a isso, promove ação lubrificante das paredes do canal, facilitando a ação dos instrumentos endodônticos na limpeza de canais radiculares (Vivacqua-Gomes *et al.*, 2002). Clinicamente, a clorexidina tem sido utilizada na terapia

endodôntica sem apresentar reações adversas, mesmo quando em contato com os tecidos periapicais, permitindo ampliar o forame apical.

Semelhantemente ao NaOCl 5,25%, o hidróxido de cálcio após 1h induziu fragmentação da porção bioativa do lipídeo A. Safavi & Nichols (1993), Barthel *et al.* (1996) e Buck *et al.* (2001) estudando o efeito do hidróxido de cálcio sobre o lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano, demonstraram que os íons hidroxila podem hidrolisar o LPS presente na parede celular das bactérias, degradando o lipídio A e conseqüentemente, neutralizando seu efeito residual após a lise celular.

3.10 Avaliação do potencial inflamatório do LPS após diferentes tratamentos –Ativação de TLR-4

Quando comparado aos demais tratamentos, LPS tratado com NaOCl 5,25% demonstrou baixa ou nenhuma atividade imunoestimuladora em receptores TLR-4. Concomitantemente, análise estrutural do LPS demonstrou ausência de picos e bandas de lipídeo A/ LPS.

De acordo com os resultados do presente trabalho, NaOCl em altas concentrações possui a habilidade de detoxificação do LPS, alterando estruturalmente a porção bioativa do LPS - lipídeo A- corroborando com os achados de Hong *et al.*, 2016. As demais concentrações do hipoclorito de sódio (2,5 % e 1%) e demais substâncias químicas auxiliares pareceram ser

insuficientes para neutralização dos efeitos citotóxicos do LPS nas células testadas.

A completa inativação dos efeitos imunoestimuladores do LPS durante o tratamento endodôntico pode prevenir a persistência da periodontite apical aguda. Este trabalho revelou que a neutralização do LPS é obtida a partir de 24h de contato direto da pasta de hidróxido de cálcio.

Sabe-se que modificações sutis na estrutura do lípido A, tais como, alteração do número, posição, ou comprimento de ácidos graxos estão intimamente relacionadas à alteração da sinalização via TLR4 e consequentemente de seus efeitos imunoestimuladores (Hajjar *et al.*, 2002, Jain *et al.*, 2013, To *et al.*, 2015).

Analisados em conjunto, os resultados do presente trabalho remetem a uma questão de discussão de longa data na comunidade endodôntica: a realização do tratamento endodôntico em sessão única ou em múltiplas sessões.

O emprego de técnicas de instrumentação simplificada, equipamentos modernos tais como aparelhos mecanizados utilizando limas de NiTi e sistemas reciprocantes, magnificação do campo operatório por meio de microscopia e localizadores eletrônicos foraminais fizeram com que se reduzisse o tempo para concretização do tratamento endodôntico, permitindo sua conclusão em uma única sessão.

Particularmente para redução de endotoxinas, a literatura enfatiza que o tratamento em múltiplas sessões mostrou-se mais eficaz do que em única sessão

(Xavier *et al.*, 2013). Os achados deste trabalho também demonstraram que o uso de uma medicação intracanal favorece a redução dos níveis de endotoxinas obtidos após o preparo químico-mecânico.

Contudo, é válido ressaltar que para redução bacteriana, nem o tratamento em sessão única, nem o em múltipla sessão, elimina completamente as bactérias presentes em biofilmes, em áreas distantes do canal principal (Kvist *et al.*, 2004; Gurgel-Filho *et al.*, 2007). Em seu estudo, Orstavik *et al.* (1991) verificaram que o hidróxido de cálcio não permitiu a eliminação completa dos microrganismos, além disso, observaram que houve a recolonização bacteriana após o seu uso.

Pouca ou nenhuma informação é disponível na literatura acerca da redução bacteriana e/ou concentração de endotoxinas que o preparo químico-mecânico deve atingir para promover o desequilíbrio do processo inflamatório a favor do hospedeiro e iniciar assim, o reparo da região perirradicular. Desta forma, é oportuno ressaltar que a presença de microrganismos (ou endotoxinas) durante o tratamento endodôntico pode não conduzir ao fracasso, mas certamente, sua ausência favorece o sucesso.

Apesar das limitações dos procedimentos de tratamento na erradicação completa da infecção endodôntica, a taxa de sucesso atualmente do tratamento endodôntico é muito alta e previsível. Isso ocorre porque um tratamento adequado geralmente consegue reduzir e controlar a infecção, a ponto de não comprometer a cicatrização do tecido perirradicular. Portanto, o tratamento endodôntico é uma

abordagem muito importante para salvar os dentes e mantê-los saudáveis na cavidade oral. Mesmo nos casos onde a periodontite apical não cicatriza ou emerge após o tratamento endodôntico inicial, os canais radiculares podem ainda ser retratados, ou o dente ser submetido à cirurgia perirradicular, com chances razoavelmente elevadas de restaurar a saúde do tecido perirradicular e manter o dente na cavidade oral (Gomes et al., in press).

Finalmente, considerando o papel das bactérias e seus produtos na indução e perpetuação de lesões pulpares e perirradiculares, é necessário estabelecer diretrizes para o tratamento endodôntico, objetivando não apenas obter a máxima redução do fator de virulência / bacteriana dos canais radiculares infectados, mas também evitar a contaminação dos mesmos antes, durante e após o tratamento. As novas tecnologias de instrumentação e de limpeza dos canais radiculares não são ainda eficazes na limpeza de todas as áreas do sistema de canais radiculares. Conseqüentemente, são necessárias associações de técnicas de instrumentação e de irrigação do espaço pulpar, com substâncias químicas auxiliares eficazes, numa tentativa de suplementar os efeitos do preparo mecânico. Os medicamentos intracanaís atualmente disponíveis não são eficazes contra todos os microrganismos encontrados no canal radicular, devendo ser investigados novos medicamentos. Com certeza a associação das ciências básicas com a tecnologia certamente aumentará a taxa de sucesso do tratamento endodôntico (Gomes et al., in press).

3.11 Considerações finais

O presente estudo contribuiu para o conhecimento da patobiologia do LPS nas infecções endodônticas primárias, correlacionando seus níveis com os aspectos clínicos e radiográficos dos dentes envolvidos. Além disso, foi observada a influência do preparo químico-mecânico com instrumentos rotatórios convencionais e reciprocantes, do alargamento apical e da medicação intracanal, na redução do conteúdo infeccioso/endotóxico. Foi verificada, pela primeira vez na literatura endodôntica, a influência das substâncias químicas auxiliares e da medicação à base de hidróxido de cálcio, na ausência do fluxo e refluxo das soluções irrigadoras, sobre a estrutura e bioatividade do lipopolissacarídeo bacteriano, concluindo que o hipoclorito de sódio 5.25% utilizado na irrigação dos canais radiculares e a medicação a base de hidróxido de cálcio após 1h induziram a fragmentação da porção bioativa do lipídeo A presente nos LPS. Também foi validado, pela primeira vez na Endodontia, o método LAL de quantificação de endotoxina, perante a presença de diferentes substâncias químicas auxiliares e da medicação intracanal, assim como na presença de exsudato inflamatório.

Para atingirmos nos objetivos foi utilizado técnicas de cultura e moleculares para detecção dos microrganismos; ELISA para quantificação de LPS e das citocinas pró-inflamatórias. A antigenicidade do conteúdo infeccioso (i.e. microrganismos + endotoxinas) presente nos canais radiculares foi testada contra macrófagos na produção de citocinas pró-inflamatórias. A bioatividade do LPS frente a diferentes substâncias químicas e medicação à base de hidróxido de

cálcio na ausência do fluxo e refluxo da solução irrigadora foi testada com a espectrometria de massa (MALDI-TOF) e silver staining, e ativação dos receptores TLR-4.

Estudos clínicos, como o presente, são necessários e devem ser realizados para confirmar a superioridade dos novos sistemas de limpeza dos canais radiculares, métodos e substâncias em relação aos convencionais, de maneira a reduzir a infecção destes canais e conseqüentemente acelerar o processo de reparo dos tecidos perirradiculares.

. Entretanto, tais estudos devem ser amparados nos conhecimentos obtidos nas ciências básicas, incluindo microbiologia, imunobiologia e patologia, para um melhor entendimento do processo saúde-doença. Na verdade, a associação das ciências básicas como desenvolvimento tecnológico com certeza aumentará as taxas de sucesso do tratamento endodôntico.

4 CONCLUSÃO

De acordo com as metodologias utilizadas no presente estudo, foi possível concluir que:

1. As características de desempenho - precisão e reprotubilidade- do teste cinético turbidimétrico para quantificação de endotoxinas são influenciadas pela interação do substrato Limulus Amebocyte Lysate (LAL) e substâncias químicas utilizadas na terapia endodôntica.
2. Endotoxinas estão presentes em todos os canais radiculares, estimulando a produção de citocinas pró-inflamatórias. Procedimentos adicionais após o PQM potencializam a redução de endotoxinas. Conseqüentemente, há progressiva redução do potencial inflamatório do conteúdo endodôntico quanto à produção de IL1- β e TNF- α .
3. O sistema rotatório recíprocante de lima única, Reciproc (R25), foi tão efetivo quanto os sistemas rotatórios convencionais de múltiplas limas na remoção de bactérias e de endotoxinas de canais radiculares contaminados. A ação de alargamento foraminal associado a uma irrigação copiosa parece ser mais relevante para remoção de bactérias e endotoxinas do que o número de limas empregado para esta finalidade.
4. Independente da substância química auxiliar, seja NaOCl 2,5% ou CLX gel 2%, a maior redução de endotoxinas ocorre após o preparo químico-mecânico e após uso da medicação intracanal à base de hidróxido de cálcio.
3. NaOCl 5,25% e pasta de hidróxido de cálcio são capazes de induzir perda de detecção dos picos de lipideo A/ LPS, comprometendo sua integridade

estrutural, e portanto, neutralizando seu potencial imunestimulador em receptores TLR-4.

REFERÊNCIAS

Al-Qutub MN, Braham PH, Karimi-Naser LM, Liu X, Genco CA, Darveau RP. Hemin-dependent modulation of the lipid A structure of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide. *Infect Immun*. 2006;74:4474-85.

Ashida H, Ogawa M, Kim M, Mimuro H, Sasakawa C. Bacteria and host interactions in the gut epithelial barrier. *Nat Chem Biol*. 2011;8:36-45.

Bainbridge BW, Coats SR, Darveau RP. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide displays functionally diverse interactions with the innate host defense system. *Ann Periodontol*. 2002; 7: 29-37.

Barile FA, Dierickx PJ, Kristen U. In vitro cytotoxicity testing for prediction of acute human toxicity. *Cell Biol Toxicol*. 1994;10:155-62.

Barthel CR, Levin L.G., Reisner H.M., Trope M. TNF- α release in monocytes after exposure to calcium hydroxide treated *Escherichia coli* LPS. *Int. Endod. J*. 1997; 30: 155-9.

Baugh D, Wallace J. The role of apical instrumentation in root canal treatment: a review of the literature. *J Endod*. 2005;31:333- 40.

Baumgartner J.C., Bae K.S., Xia T., Whitt, J., David L.L. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and polymerase chain reaction for differentiation of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*. J. Endod. 1999; 25: 324-8.

Baumgartner JC, Xia T. Antibiotic susceptibility of bacteria associated with endodontic abscesses. J. Endod. 2003; 29: 44-7.

Baumgartner, J.C., Falkler Jr, W.A. Bacteria in the apical 5 mm of infected root canals. J. Endod. 1991; 17: 380-3.

Becking AG. Complications in the use of sodium hypochlorite during endodontic treatment. Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. 199; 71: 192-96.

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;26:236-9.

Berutti E, Marini R, Angeretti A. Penetration ability of different irrigants into dentinal tubules. J Endod. 1997;23:725-7.

Berutti E, Paolino DS, Chiandussi GA, Alovisi M, Cantatore G, Castellucci A, Pasqualini D. Root canal anatomy preservation of WaveOne reciprocating files with or without Glide Path. J Endod, 2012;38:101-4.

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

Buck RA, Eleazer PD, Staat RH, Scheetz JP. Effectiveness of three endodontic irrigants at various tubular depths in human dentin. J Endod. 2001; 27: 206-8.

Burklein S, Hinschitza K, Dammaschke T, Schafer E. Shaping ability and cleaning effectiveness of two single-file systems in severely curved root canals of extracted teeth: Reciproc and WaveOne versus Mtwo and ProTaper. *Int Endod J.* 2012;45:449-461.

Burton AJ, Carter HE. Purification and characterization of the lipid A component of the lipopolysaccharides from *Escherichia Coli*. *Biochemistry* 1964;3:411-8.

Caroff M, Karibian D. Structure of bacterial lipopolysaccharides. *Carbohydr Res.* 2003;338:2431-47.

Chan EC, McLaughlin R. Taxonomy and virulence of oral spirochetes. *Oral Microbiol Immunol.* 2000;15:1-9.

Coats SR, Jones JW, Do CT, Braham PH, Bainbridge BW, To TT, Goodlett DR, Ernst RK, Darveau RP. Human Toll-like receptor 4 responses to *P. gingivalis* are regulated by lipid A 1- and 4-phosphatase activities. *Cell Microbiol.* 2009; 11:1587-99.

Dahlen G, Möller AJR. *Microbiology*, 1 st edn. St. Louis, Missouri, USA: Mosby Year Book, pp. 444-475.1992.

Dametto, F.R. estudo in vitro da antimicrobiana imediata a mediate da clorexidina gel 2% usada como irrigante endodôntico contra *Enterococcus faecalis*. Piracicaba, 2002. 100 p. Tese (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.

Darveau RP, Pham TT, LemLey K, Reife RA, Bainbridge BW, Coats SR, Howald WN, Way SS, Hajjar AM. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide contains

multiple lipid A species that functionally interact with both toll-like receptors 2 and 4. *Infect Immun.* 2004; 72: 5041-51.

Dixon DR, Darveau RP. Lipopolysaccharide heterogeneity: innate host responses to bacterial modification of lipid a structure. *J Dent Res.* 2005 Jul;84:584-95.

Endo MS, Ferraz CC, Zaia AA, Almeida JF, Gomes BP. Quantitative and qualitative analysis of microorganisms in root-filled teeth with persistente infection: Monitoring of the endodontic retreatment. *Eur J Dent.* 2013;7:302-9.

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;31:2575-83.

Endo MS, Pavan AJ, Pavan NNO, Queiroz AF, Santos ACL. Endodontia em sessão única ou múltipla: revisão da literatura/ Endodontics in single or multiple visits: literature review. *RFO UPF;* 20:413,2015.

Ferraz CCR, Gomes BPFA, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. *In vitro* assessment of the antimicrobial action and mechanical ability of chloerhexidine gel as an endodontic irrigant. *J endod* 2001;27:452-5.

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.

Foschi F, Nucci C, Montebugnoli L, Marchionni S, Breschi L, Malagnino VA, Prati C. SEM evaluation of canal wall dentine following use of Mtwo and ProTaper NiTi rotary instruments. *Int Endod J.* 2004; 37:832-9.

Gomes BP, Berber VB, Kokaras AS, Chen T, Paster BJ. Microbiomes of Endodontic-Periodontal Lesions before and after Chemomechanical Preparation. *J Endod.* 2015;41:1975-84.

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

Gomes BP, Ferraz CC, Vianna ME, Berber VB, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. In vitro antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J.* 2001;34:424-8.

Gomes BP, Jacinto RC, Pinheiro ET, Sousa EL, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ. *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* in endodontic lesions detected by culture and by PCR. *Oral Microbiol. Immunol.* 2005; 20: 211-15.

Gomes BP, Jacinto RC, Pinheiro ET, Sousa EL, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho F. J. *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* in endodontic lesions detected by culture and by PCR. *Oral Microbiol. Immunol.* 2005; 20: 211-15.

Gomes BP, Jacinto RC, Pinheiro ET, Sousa EL, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ. Molecular analysis of *Filifactor alocis*, *Tannerella forsythia*, and *Treponema*

denticola associated with primary endodontic infections and failed endodontic treatment. J Endod. 2006;32:937-40.

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;35:1350-3.

Gomes BPFA, Drucker DB, Lilley JD. Association of specific bacteria with some endodontic signs and symptoms. Int. Endod. J. 1996a: 27: 291-298.

Gomes BPFA, Montagner F. O papel do diagnóstico molecular no estudo das infecções de origem endodôntica: conceitos, técnicas e aplicações. In: Ferrari, P.; Bombana, A.C. A infecção endodôntica e sua resolução. São Paulo: Santos. Cap 2. p. 23-46. 2010.

Gomes BPFA, Pinheiro ET, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ. Microbial analysis of canals of root-filled teeth with periapical lesions using polymerase chain reaction. J Endod. 2008; 34:537-40.

Gomes BPFA, Rôças IN, Siqueira JF Jr. Endodontics. Chapter 18. 3rd ed. ASM's Oral Microbiol and Immunol (in press).

Griffie M. B., Patterson S. S., Miller C. H., Kafrawy A. H., Newton C. W. The relationship of *Bacteroides melaninogenicus* to symptoms associated with pulpal necrosis. Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. 1980; 50: 457-61.

Gründling GL, Melo TA, Montagner F, Scarparo RK, Vier-Pelisser FV. QMix® irrigant reduces lipopolysaccharide (LPS) levels in an in vitro model. J Appl Oral Sci. 2015;23:431-5.

Gurgel-Filho ED, Vivacqua-Gomes N, Gomes BP, Ferraz CC, Zaia AA, Souza-Filho FJ. In vitro evaluation of the effectiveness of the chemomechanical preparation against *Enterococcus faecalis* after single- or multiple-visit root canal treatment. *Braz Oral Res* 2007; 21:308-13.

Hajjar AM, Ernst RK, Tsai JH, Wilson CB, Miller SI. Human Toll-like receptor 4 recognizes host-specific LPS modifications. *Nat Immunol*. 2002;3:354-9.

Hecker H, Bartha T, Löst C, Weiger R. Determining the apical preparation size in premolars: part III. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010;110:118-24.

Homji NF, Mao X, Langsdorf EF, Chang SL. Endotoxin-induced cytokine and chemokine expression in the HIV-1 transgenic rat. *J Neuroinflammation*. 2012; 4;9:3.

Hong CY, Lin SK, Kok SH, Cheng SL, Lee MS, Wang TM, Chen CS, Lin LD, Wang JS. The role of lipopolysaccharide in infectious bone resorption of periapical lesion. *J. Oral Pathol. Med*. 2004;33: 162-169.

Hong SW, Baik JE, Kang SS, Kum KY, Yun CH, Han SH. Sodium Hypochlorite Inactivates Lipoteichoic Acid of *Enterococcus faecalis* by Deacylation. *J Endod*. 2016;42:1503-8.

Horiba N, Maekawa Y, Abe Y, Ito M, Matsumoto T, Nakamura H. Correlations between endotoxin and clinical symptoms or radiolucent areas in infected root canals. *Oral Surg Oral Med. Oral. Pathol*. 1991;71:492-5.

Hosoya S, Matsushima K. Stimulation of interleukin-1 beta production of human dental pulp cells by *Porphyromonas endodontalis* lipopolysaccharide. J Endod. 1997; 23: 39-42.

Jacinto RC, Gomes BP, Ferraz CC, Zaia AA, Filho FJ. Microbiological analysis of infected root canals from symptomatic teeth with periapical periodontitis and the antimicrobial susceptibility of some isolated anaerobic bacteria. Oral Microbiol. Immun. 2003; 18: 285-292.

Jacinto RC, Gomes BP, Shah HN, Ferraz CC, Zaia AA, Sousa-Filho FJ. Incidence and antimicrobial susceptibility of *Porphyromonas gingivalis* isolated from mixed endodontic infections. Int. Endod. 2006; 39:62-70.

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; 54: 777-783.

Jain S, Coats SR, Chang AM, Darveau RP. A novel class of lipoprotein lipase-sensitive molecules mediates Toll-like receptor 2 activation by *Porphyromonas gingivalis*. Infect Immun 2013; 81:1277-86.

Jiang J, Zuo J, Hurst IR, Holliday S. The synergistic effect of peptidoglycan and lipopolysaccharide on osteoclast formation. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod. 2003a; 96: 738-43.

Takehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1965;20:340-9.

Khabbaz MG, Anastasiadis PL, Sykaras SN. Determination of endotoxins in caries association with pulpal pain. *Int. Endod. J.* 2000; 33:132-137.

Kuriyama T, Karasawa T, Nakagawa K, Nakamura S, Yamamoto E. Antimicrobial susceptibility of major pathogens of orofacial odontogenic infections to 11 beta-lactam antibiotics. *Oral Microbiol Immunol.* 2002;17:285-9.

Kvist T, Molander A, Dahlén G, Reit C. Microbiological evaluation of one- and two-visit endodontic treatment of teeth with apical periodontitis: a randomized, clinical trial. *J Endod* 2004; 30:572-6.

Lana MA, Ribeiro-Sobrinho AP, Stehling R, Garcia GD, Silva BK, Hamdan JS, Nicoli JR, Carvalho MA, Farias Lde M. Microorganisms isolated from root canals presenting necrotic pulp and their drug susceptibility in vitro. *Oral Microbiol Immunol.* 2001;16:100-5.

Leonardo ML, Silva RAB, Assed S, Nelson-Filho P. Importance of bacterial endotoxin (LPS) in endodontics. *J. App. Oral Sci.* 2004; 12: 93-98.

Machado ME, Sapia LA, Cai S, Martins GH, Nabeshima CK. Comparison of two rotary systems in root canal preparation regarding disinfection. *Journal of Endodontics* 2010;36: 1238-40.

Maekawa LE, Carvalho AS, Cardoso PE, Xavier ACC, Oliveira LD, Koga-Ito CY. Atividade antimicrobiana de um EDTA gel associado a peróxido de hidrogênio sobre cepas clínicas de *Candida albicans*. *Cien Odontol Bras* 2011; 12:57-60.

Marinho AC, Martinho FC, Zaia AA, Ferraz CC, Gomes BP. Monitoring the effectiveness of root canal procedures on endotoxin levels found in teeth with chronic apical periodontitis. *J Appl Oral Sci.* 2014;22:490-5.

Marinho ACS, Martinho FC, Zaia AA, Ferraz CCR, Gomes BPF. Influence of the apical enlargement size on the endotoxin level reduction of dental root canals. *J Appl Oral Sci* 2012;20: 661-6.

Martinho FC, Chiesa WM, Leite FR, Cirelli JA, Gomes BP. Antigenic activity of bacterial endodontic contents from primary root canal infection with periapical lesions against macrophage in the release of interleukin-1beta and tumor necrosis factor alpha. *J Endod.* 2010;36:1467-74.

Martinho FC, Chiesa WM, Leite FR, Cirelli JA, Gomes BP. Correlation between clinical/radiographic features and inflammatory cytokine networks produced by macrophages stimulated with endodontic content. *J Endod.* 2012;38:740-5.

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;37:163-7.

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; 34, 268-72.

Matsuo T, Ebisu S, Shimabukuro Y, Ohtake T, Okada H. Quantitative analysis of immunocompetent cells in human periapical lesions: correlations with clinical findings of the involved teeth. *J Endod.* 1992; 18: 497-500.

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

Melo TA, Gründling GS, Montagner F, Scur AL, Steier L, Scarparo RK, Figueiredo JA, Vier-Pelisser FV. LPS levels in root canals after the use of ozone gas and high frequency electrical pulses. *Braz Oral Res.* 2016;30.

Metzger Z. Macrophages in periapical lesions. *Endod Dent Traumatol.* 2000; 16: 1-8.

Montagner F, Jacinto RC, Signoretti FGC, Gomes BPFA. *Treponema* species detected in infected root canals and acute apical abscess exudate. *J Endod.* 2010; 36: 1796-9.

Munson EL, Pfaller MA, Doern GV. Modification of dienes mutual inhibition test for epidemiological characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *J Clin Microbiol.* 2002;40:4285-8.

Murdoch DA, Mitchelmore IJ, Tabaqchali S. The clinical importance of gram-positive anaerobic cocci isolated at St Bartholomew's Hospital, London, in 1987. *J Med Microbiol.* 1994;41:36-44.

Nair PNR. Light and electron microscopic studies of root canal flora and periapical lesions. *J. Endod.*, v.13, p.29, 1987.

Nissan R, Segal H, Pashley D, Stevens R, Trowbridge H. Ability of bacterial endotoxin to diffuse through human dentin. *J Endod.* 1995;21:62-4.

Novitsky TJ, Roslansky PF, Siber GR, Warren HS. Turbidimetric method for quantifying serum inhibition of *Limulus amoebocyte lysate*. *J Clin Microbiol.* 1985; 21: 211-6.

Ohno N., Morrison D.C. Interaction of Lysozyme with Bacterial Lipopolysaccharide. *The FASEB Journal: Official Publication of American Societies for Experimental Biology* 1988; 2: 680.

Oliveira LD, Carvalho CA, Carvalho AS, Alves JS, Valera MC, Jorge AO. Efficacy of endodontic treatment for endotoxin reduction in primarily infected root canals and evaluation of cytotoxic effects. *J Endod* 2012;38:1053-7.

Oliveira LD, Jorge AOC, Carvalho CAT, Koga-Ito CY, Valera MC. In vitro effects of endodontic irrigants on endotoxins in root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007; 104: 135-42.

Orstavik D, Kerekes K, Molven O. Effects of extensive apical reaming and calcium hydroxide dressing on bacterial infection during treatment of apical periodontitis: a pilot study. *Int Endod J* 1991; 24:1-7

Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, Sahasrabudhe A, Dewhirst FE. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol.* 2001;183:3770-83.

Peters LB, Wesselink PR, van Winkelhoff AJ. Combinations of bacterial species in endodontic infections. *Int. Endod. J.* 2002; 35:698-702.

Petsch D, Anspach FB. Endotoxin removal from protein solutions. *J Biotech* 2000; 76:97-119.

Pezelj-Ribaric S, Magasic K, Prpic J, Miletic I, Karlovic Z. Tumor necrosis factor-alpha in periapical tissue exudates of teeth with apical periodontitis. *Mediators of inflammation* 2007;1-4.

Prso IB, Kocjan W, Simic H, Brumini G, Pezelj-Ribaric S, Borcic J, et al. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin 6 in human periapical lesions. *Mediators of Inflammation* 2007; 1-4.

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

Rahimi S, Janani M, Lotfi M, Shahi S, Aghbali A, Vahid Pakdel M, Salem Milani A, Ghasemi N. A review of antibacterial agents in endodontic treatment. *Iran Endod J.* 2014;9:161-8.

Ribeiro MB, Miyagaki DC, Souza MA, Marceliano-Alves MF, Silva SJA, Malvar MFG, Carvalho FB. Capacidade de alargamento e aumento da área de canais radiculares curvos produzidos pelos sistemas automatizados Protaper® e Waveone. *Coletâneas na pratica odontológica Cap 10, ed Plena, Passo Fundo, RS, 2014, p 77-82.*

Rietschel ET, Brader H. Bacterial- Endotoxins. *Scientific. Americam.* 1992: 267: 54-61.

Riggio MP, Lennon A, Smith A. Detection of peptostreptococcus micros DNA in clinical samples by PCR. *J Med Microbiol.* 2001;50:249-54.

Rôças IN, Siqueira JF Jr, Andrade AF, Uzeda M. Oral treponemes in primary root canal infections detected by nested PCR. *Int. Endod. J.* 2003: 36: 20-26.

Rôças IN, Provenzano JC, Neves MA, Siqueira JF Jr. Disinfecting Effects of Rotary Instrumentation with Either 2.5% Sodium Hypochlorite or 2% Chlorhexidine as the Main Irrigant: A Randomized Clinical Study. *J Endod.* 2016;42:943-7.

Rolph HJ, Lennon A, Riggio MP, Saunders WP, MacKenzie, Coldero L, Bagg J. Molecular identification of microorganisms from endodontic infections. *J. Oral Clin. Microbiol.* 2001;39:3282-3289.

Safavi KE, Nichols FC. Effect of calcium hydroxide on bacterial lipopolysaccharide. *J Endod.* 1993;19:76-8.

Sakamoto M, Rôças I.N., Siqueira J.F., Benno Y. Molecular analysis of bacteria in asymptomatic and symptomatic endodontic infections. *Oral Microbiology and Immunology* 2006; 21: 112-122.

Sassone LM, Fidel RA, Faveri M, Figueiredo L, Fidel SR, Feres M. A microbiological profile of unexposed and exposed pulp space of primary endodontic infections by checkerboard DNA-DNA hybridization. *J Endod.* 2012; 38:889-93.

Schäfer E, Erler M, Dammaschke T. Comparative study on the shaping ability and cleaning efficiency of rotary Mtwo instruments. Part 1. Shaping ability in simulated curved canals. *Int Endod J.* 2006; 39: 196-202.

Schein B, Schilder H. Endotoxin content in endodontically involved teeth. *J. Endod.* 1975: 1: 19-21.

Signoretti FG, Gomes BP, Montagner F, Barrichello Tosello F, Jacinto RC. Influence of 2% chlorhexidine gel on calcium hydroxide ionic dissociation and its

ability of reducing endotoxin. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2011; 111:653-8.

Silva EJ, Teixeira JM, Kudsi N, Sassone LM, Krebs RL, Coutinho-Filho TS. Influence of Apical Preparation Size and Working Length on Debris Extrusion. Braz Dent J. 2016; 27:28-31.

Silva LA, Leonardo MR, Assed S, Tanomaru FM. Histological study of the effect of some irrigating solutions on bacterial endotoxin in dogs. Brazilian Dental Journal 2004; 15: 109-114.

Siqueira JF Jr, Roças IN. Uncultivated phylotypes and newly named species associated with primary and persistent endodontic infections. J Clin. Microbiol. 2005; 43: 3314-3319.

Siqueira JF, Roças IN, Santos SR, Lima KC, Magalhães FA, de Uzeda M. Efficacy of instrumentation techniques and irrigation regimens in reducing the bacterial population within root canals. J. Endod. 2002; 28: 181-184.

Siqueira JF, Rôças IN. Polymerase chain reaction detection of *Propionibacterium propionicus* and *Actinomyces radientis* in primary and persistent endodontic infections. Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod. 2003; 96: 215-22.

Siqueira Jr, Roças IN, Favieri A, Oliveira JCM, Santos KRN. Polymerase chain reaction detection of *Treponema denticola* in endodontic infections within root canals. Int. Endod. J. 2001; 34: 280-284.

Sjogren U, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of ultrasonic root canal instrumentation. Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. 1987; 63: 336-70.

Sonntag D, Ott M, Kook K, Stachniss V. Root canal preparation with the NiTi systems K3, Mtwo and ProTaper. *Aust Endod J.* 2007; 33:73-81.

Sousa EL, Martinho FC, Nascimento GG, Leite FR, Gomes BP. Quantification of endotoxins in infected root canals and acute apical abscess exudates: monitoring the effectiveness of root canal procedures in the reduction of endotoxins. *J Endod.* 2014;40:177-81.

Sundqvist G. Ecology of the root canal flora. *J Endod.* 1992;18:427-430.

Sundqvist G. Taxonomy, ecology and pathogenicity of the root canal flora. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 1994; 78: 522-530.

Tanomaru JMG, Leonardo MR, Tanomaru-Filho M, Bonetti-Filho L, Silva LAB. Effect of different irrigation solutions and calcium hydroxide on bacterial LpS. *Int. Endod J.* 2003; 36: 733-739.

Teles AM, Manso MC, Loureiro S, Silva R, Madeira IG, Pina C, Cabeda JM. Effectiveness of two intracanal dressings in adult Portuguese patients: a qPCR and anaerobic culture assessment. *Int Endod J.* 2014;47:32-40.

To TT, Gumus P, Nizam N, Buduneli N, Darveau RP. Subgingival Plaque in Periodontal Health Antagonizes at Toll Like Receptor 4 and Inhibits E Selectin Expression on Endothelial Cells. *Infect Immun.* 2015;120-6.

Torabinejad M, Cho Y, Khademi AA, Bakland LK, Shabahang S. The effect of various concentrations of sodium hypochlorite on the ability of MTAD to remove the smear layer. *J Endod.* 2003 Apr;29(4):233-9. Erratum in: *J Endod.* 2003;29:424

Trope M, Debelian G. Microbial control: the first stage of root canal treatment. *Gen Dent.* 2009;57:580-8.

Vahid A, Roohi N, Zayeri F. A comparative study of four rotary NiTi instruments in preserving canal curvature, preparation time and change of working length. *Aust Endod J* 2009;35:93-97.

Versiani MA, Leoni GB, Steier L, De-Deus G, Tassani S, Pécora JD, de Sousa-Neto MD. Micro-computed tomography study of oval-shaped canals prepared with the self-adjusting file, Reciproc, WaveOne, and ProTaper universal systems. *J Endod.* 2013;39:1060-6, 2013.

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; 22, 411-8.

Vivacqua-Gomes N, Ferraz CC, Gomes BP, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Influence of irrigants on the coronal microleakage of laterally condensed gutta-percha root fillings. *Int Endod J.* 2002; 35:791-5.

Webber J, Machtou P, Pertot W, Kuttler S, Ruddle C, West J. The WaveOne single-file reciprocating system. *Root Int Mag Endod.* 2011;7:28-33.

Wilson M, Reddi K, Henderson B. Cytokine-inducing components of periodontopathogenic bacteria. *J Periodontal Res* 1996; 31:393-407.

Xavier AC, Martinho FC, Chung A, Oliveira LD, Jorge AO, Valera MC, Carvalho CA. One-visit versus two-visit root canal treatment: effectiveness in the removal of endotoxins and cultivable bacteria. J Endod. 2013;39:959-64.

Yoshida M, Fukushima H, Yamamoto K, Ogawa K, Sagawa H. Correlation between clinical symptoms and microorganisms isolated from root canal of teeth with periapical pathosis. J. Endod.1987: 13: 24-28.

APÊNDICE I – Material e métodos e ilustrações dos experimentos realizados na pesquisa.

ARTIGO 1

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

Para a contaminação das raízes, foram utilizadas culturas puras de *Escherichia coli* (ATCC 25922) em caldo de BHI broth (Oxoid Unipath Ltd., Basingstoke, Inglaterra). *Escherichia coli* foi subcultivada em BHI ágar (Oxoid Unipath Ltd., Basingstoke, Inglaterra) e incubada em estufa microbiológica (Fanem Ltda., São Paulo-SP, Brasil) a 37 °C em atmosfera de 10% de gás carbônico (CO₂), por 24 h. Decorrido o tempo de incubação, as colônias isoladas foram transportadas para tubos de vidro com tampa rosqueável contendo 5,0 mL de BHI broth, respeitando o padrão de concentração 0,5 da Escala McFarland (1.5×10^8 bactérias/mL), com absorvância de 800 nm através do espectrofotômetro (FEMTO 432, Marconi, Piracicaba-SP, Brasil). Na câmara de fluxo laminar (Pachane Equipamentos para Laboratórios Ltda., Piracicaba-SP, Brasil), após a agitação mecânica em vórtex (VORTEX MA 162, Marconi Equipamentos para Laboratórios Ltda., Piracicaba, SP) dos tubos contendo as raízes e o inóculo bacteriano com concentração adequada, 2 mL de BHI broth estéril foi substituído por 2 mL da

suspensão de *Escherichia coli*. Posteriormente, o frasco foi vedado e incubado em estufa microbiológica a 37 °C por 21 dias, com trocas de 1mL do meio BHI contaminado por 1mL de BHI estéril a cada 2 dias para se evitar a saturação deste meio. O crescimento bacteriano verificou-se pela presença de turbidez do meio. A pureza das culturas foi confirmada através da morfologia das colônias plaqueadas em BHI ágar, teste de catalase positivo e pelo teste Polymerase Chain Reaction (PCR 16S rDNA).

Os espécimes foram divididos aleatoriamente em quatro grupos de acordo com o sistema de instrumentação utilizado no preparo do canal radicular: GI. Reciproc R25) (VDW, Munique, Alemanha) (n = 10); Mtwo (VDW, Munique, Alemanha) (n = 10); GIII. ProTaper Universal (Dentsply Maillefer) (n = 10); GIV. Race™ FKG (FKG Dentária, Lachaux-deFonds, Suíça) (n = 10).

Para cada grupo experimental, uma vez que o instrumento tinha atingido a completa extensão do canal, este era removido. Cada instrumento foi utilizado para preparar somente um canal radicular. Em cada grupo, dois canais não foram contaminados foram instrumentados e utilizados como controlos negativos. Devido ao número diferente de limas nos diferentes grupos, um volume total de 20 ml de água de LAL foi padronizado para cada canal. Todos os procedimentos de irrigação foram realizados com uma seringa de 5 ml e uma agulha de calibre 27 (Ultradent Products, South Jordan, UT, EUA). Após a instrumentação (S2), coletas do conteúdo endodôntico foram realizadas como anteriormente descrito, de modo a determinar a carga bacteriana e quantificar os níveis de endotoxina bacteriana.

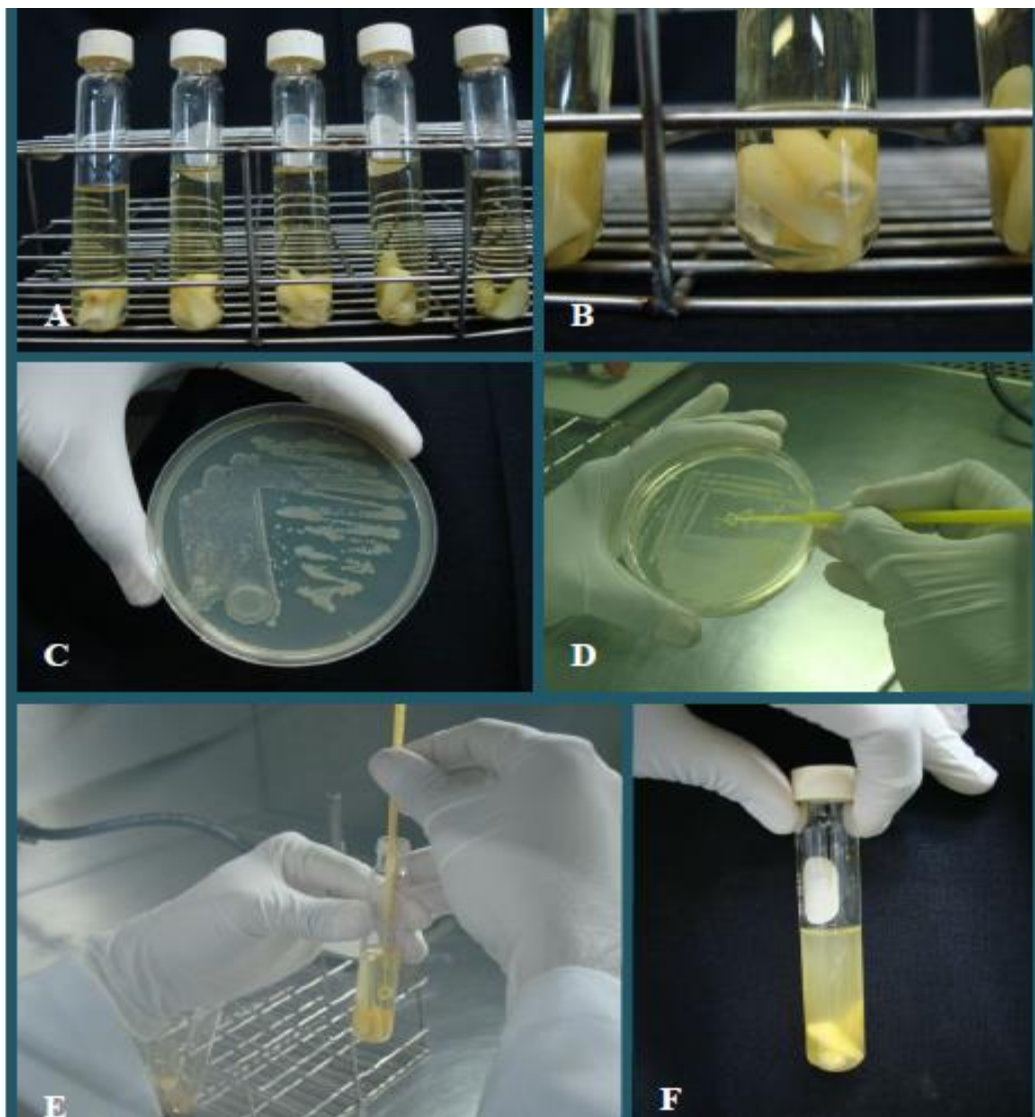


Figura 1 – Contaminação dos espécimes com *Escherichia coli* (ATCC 25922): A – Espécimes no LB broth estéril; B – Visão aproximada dos espécimes no meio estéril; C – Cultura pura de *Escherichia coli* antes da inoculação; D – Coleta do microrganismo da placa para inoculação; E – Inoculação do microrganismo no meio para contaminação dos espécimes; F – Espécimes contaminados após 21 dias.

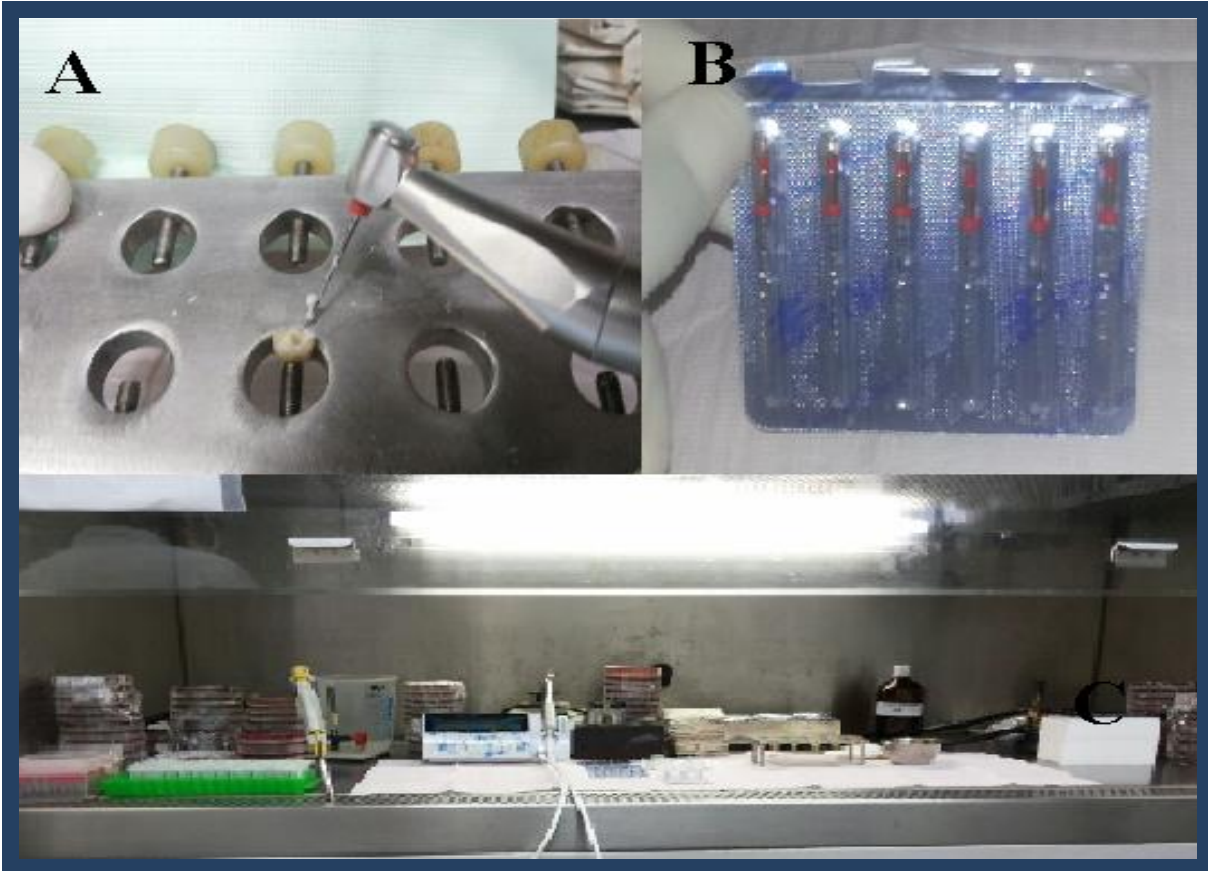


Figura 2 – Sistema Reciproc R 25. A- Aspecto final do instrumento R25 após corte dentinário; B- Sistema Reciproc; C- Fluxo laminar.

ARTIGO 3

Seleção da amostra

Foram selecionados 30 pacientes que compareceram à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo-Brasil, os quais possuíam dentes unirradiculares indicados para a realização de tratamento endodôntico devido à periodontite apical crônica. Por se tratar de um estudo microbiológico, fatores que poderiam interferir na microbiota do canal radicular foram levados em consideração, e desta forma, foram excluídos do presente estudo: pacientes que fizeram uso de antifúngicos e antibióticos (num

período mínimo de 3 meses anterior à consulta), pacientes com comprometimento sistêmico, profundidade de sondagem periodontal do dente analisado maior que 3 mm; dentes com fratura radicular; dor espontânea, câmara pulpar com exposição ao meio bucal, impossibilidade de isolamento absoluto ou de introdução do cone de papel no comprimento de trabalho.

O projeto foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, da Universidade Estadual de Campinas, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (protocolo nº 018/2014). Os pacientes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido elaborado de acordo com as normas do Comitê de Ética em Pesquisa antes de participar da pesquisa.

Análise clínica e radiográfica

O diagnóstico de necrose pulpar associado à presença de lesão periapical foi obtido pela realização de exame clínico-radiográfico minucioso. Formulários específicos (fichas de exame clínico) foram devidamente preenchidos durante a anamnese contendo dados quanto à idade, gênero, estado geral do paciente, história dentária progressiva e atual, exame clínico e radiográfico.

Foram realizadas radiografias periapicais pré-operatórias com auxílio de posicionador radiográfico e posteriormente, realizou-se a determinação radiográfica do tamanho da lesão periapical e avaliação do grau de destruição óssea. Após acesso aos canais radiculares, foi avaliado o aspecto físico dos canais radiculares, como presença de exsudato (seroso, purulento ou hemorrágico), presença de restos de tecido pulpar ou ausência de exsudação intracanal, denotando um canal seco.

Procedimentos clínicos

Descontaminação do campo operatório

Previamente à intervenção endodôntica foram realizados bochechos com enxaguatório bucal (clorexidina 0,12%) (Drogal, Farmácia de Manipulação, Piracicaba, SP) por 1 minuto. Em seguida, os pacientes foram anestesiados localmente e o dente envolvido recebeu polimento coronário com pedra-pomes e então isolado com lençol de borracha (isolamento absoluto) (**Figura 3-A**). Realizou-se o vedamento da interface coroa/lençol com cianocrilato (Super Bonder; Loclite Brasil Ltda, Itapevi, SP) para evitar infiltração de saliva. A antisepsia do campo operatório (dente, grampo, lençol de borracha, arco e cianocrilato) foi realizada com a utilização de *swabs* estéreis umedecidos primeiramente em H₂O₂ a 30% (v/v), e depois em NaOCl 5,25% (Drogal, Farmácia de Manipulação, Piracicaba, SP, Brasil) por 30 segundos cada, subsequentemente neutralizado com solução estéril de tiosulfato de sódio a 5% (Drogal, Farmácia de Manipulação, Piracicaba, SP) (**Figura 3-B**).

Abertura coronária

A fase de abertura coronária foi realizada em duas etapas operatórias. A água proveniente do equipo foi cessada, sendo a irrigação realizada manualmente com solução salina estéril (Drogal, Farmácia de Manipulação, Piracicaba, SP, Brasil) (**Figura 3-C**). Foram utilizadas pontas esféricas diamantadas estéreis para remoção dos contaminantes coronários (tecido cariado, restaurações defeituosas). Posteriormente, na confecção da cavidade de acesso, nova broca estéril/apirogênica (esterilizadas através de calor seco, em estufa por um período de tempo de 4 horas a 200°C) foi utilizada. Após a abertura coronária, o campo operatório e a câmara pulpar foram novamente descontaminados, seguindo o protocolo de descontaminação e em seguida neutralizados como descrito anteriormente. Foram individualizados, para cada dente, jogos de instrumentais

estéreis/apirogênicos utilizados, de forma que não houvesse nenhum tipo de contaminação. Todos os procedimentos clínicos foram realizados por um único operador.

Coletas endodônticas

Amostras do conteúdo endodôntico foram coletadas logo após a abertura coronária (C1), após o preparo químico-mecânico dos canais radiculares (C2), após irrigação final com ácido etilendiamino tetracético (EDTA) 17% (Drogal, Farmácia de Manipulação, Piracicaba, SP), após 30 de medicação à base de hidróxido de cálcio [(Ca(OH)₂ + SS)] e antes da obturação do canal radicular.

Coleta endodôntica inicial

Coleta de endotoxina/ estimulação celular (CE1)

Após abertura coronária, foi realizada coleta inicial para investigação dos níveis de endotoxina/ produção de citocinas (CE1). Para CE1, um cone de papel estéril #15 (Dentsply, Petrópolis, R.J.), previamente esterilizado a 200° C, por 4 horas em estufa, foi introduzido no comprimento aparente do dente (determinado pela radiografia periapical pré-operatória), o qual permaneceu em posição por 60 segundos. Em seguida, o cone foi transferido para tubos de vidro apirogênicos contendo 5 esferas de vidro também apirogênicas. As amostras, devidamente identificadas, foram armazenadas a -20 °C para posterior análise dos níveis de LPS.

Forma de conveniência da abertura coronária foi realizada com pontas diamantadas tronco-cônicas de extremidade inativa nº 3082 (KG Sorensen Ind. Com. Ltda, Barueri, SP) dando a conformação apropriada à cavidade, de acordo com a anatomia interna do dente. Para proporcionar um acesso livre e reto aos canais radiculares foi realizado desgaste compensatório, com a utilização de

brocas de Largo nº 2 (Maillefer Instruments, Baillagues - Switzerland). Com base nas radiografias pré-operatórias, efetuou-se a exploração dos canais radiculares com lima tipo-K nº 15 (Maillefer Instruments, Baillagues - Switzerland). A odontometria do canal radicular foi realizada com auxílio de localizador apical (Novapex, Forum Technologies, Rishon le-Zion, Israel), correspondendo ao ponto zero do localizador foraminal, com uma lima que melhor se adaptou ao diâmetro do forame apical. A seguir, os dentes foram divididos aleatoriamente em três grupos de acordo com a substância química auxiliar utilizada no preparo químico-mecânico: GI- NaOCl 2,5%; GII- CLX gel 2% e soro fisiológico 0,9% (grupo controle) (Drogal, Farmácia de Manipulação, Piracicaba, SP).

Instrumentação dos canais radiculares

Uma vez determinado o comprimento real do dente, foi realizada a instrumentação do canal radicular em toda sua extensão, correspondente ao ponto zero do localizador apical. Foi utilizado o sistema automatizado de rotação contínua Mtwo[®] (VDW, Munich, Germany), acoplado ao contra-ângulo Sirona - VDW- SILVER (VDW, Munich, Germany) de redução 6:1 com torque e velocidades pré-programadas para cada lima.

A instrumentação dos canais radiculares foi realizada seguindo a sequência de instrumentos recomendada pelo fabricante: 10/.04; 15/.05; 20/.06; 25/.06; 30/.05; 35/.04 e 40/.04. O instrumento foi inserido com leve pressão permitindo que o mesmo tocasse as paredes do canal de modo circunferencial. No momento em que o instrumento apresentou-se livre no canal radicular foi efetuada a sua troca para o diâmetro subsequente.

Irrigação dos canais radiculares

Durante o preparo químico mecânico, o protocolo de irrigação foi realizado de acordo com cada substância química auxiliar utilizada nos diferentes grupos:

- Grupo I - inundação do canal radicular com NaOCl 2,5%, sendo este renovado com 5 mL da mesma substância a cada troca de lima;
- Grupo II- inundação do canal radicular com clorexidina gel 2%, sendo esta removida com 5 mL de soro fisiológico a cada troca de lima;
- Grupo controle- inundação do canal radicular com soro fisiológico, sendo este renovado com 5 mL da mesma substância a cada troca de lima;

Após o uso do último instrumento rotatório, os canais foram irrigados com 5 mL de soro fisiológico estéril. Em seguida, foi realizada a neutralização do NaOCl 2,5% com 5mL de tiosulfato de sódio (5%) por 1 minuto (Martinho, 2007) e da CLX gel 2% com tween 80 (0,5%) associado a lecitina de soja (0,07%) (Drogal, FARMACIA de Manipulação, Piracicaba, SP) por 1 minuto (Vianna *et al.*, 2006b). Estas soluções foram posteriormente removidas com 5mL de soro fisiológico estéril.

O volume de irrigação ao final do preparo químico-mecânico foi de 45 mL para cada canal radicular tratado. Os procedimentos de irrigação foram realizados com o auxílio de seringa de 5mL (Becton Dickinson Indústrias Cirúrgicas Ltda, São Paulo, SP) e agulha hipodérmica BD 20 x 5,5 (Becton Dickinson Indústrias Cirúrgicas Ltda, São Paulo, SP) pré-curvada, introduzida até o terço médio do canal radicular. A aspiração do conteúdo dos canais radiculares foi realizada por meio de cânula aspiradora (Conjunto de aspiração – Colgran, São Paulo – SP).

Após preparo químico-mecânico, foi realizada nova coleta endodôntica para investigação dos níveis de endotoxina/ produção de citocinas (CE2). Para CE2, um novo cone de papel estéril #20 foi introduzido no comprimento real do dente, o

qual permaneceu em posição por 60 segundos. Em seguida, foi transferido para tubos de vidro apirogênicos contendo 5 esferas de vidro também apirogênicas. As amostras, devidamente identificadas, foram armazenadas a -20 °C, como recomendado pelo fabricante.

Para remoção da *smear layer*, foi realizada irrigação com 3 mL de EDTA 17%, o qual permaneceu no interior dos canais radiculares por 3 minutos, com renovação desta solução a cada minuto (Teixeira *et al.*, 2005). Em seguida, os canais foram irrigados com 5 mL de soro fisiológico estéril/apirogênico para remoção do agente quelante. Após, uma nova coleta para investigação dos níveis de endotoxina/ produção de citocinas (CE3) foi realizada como previamente descrito.

Subsequentemente, os canais foram preenchidos com a pasta preparada de fresco de Ca (OH)₂ em solução salina (1: 1). A pasta foi inserida nos canais por meio de broca Lentulo estéril (Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Suíça). Foi dada especial atenção para completamente preencher o canal com a medicação. Um pellet de algodão foi usado para condensar a medicação ao nível da entrada do canal e uma radiografia periapical foi realizada para garantir a qualidade de preenchimento do canal radicular.

Em seguida, as cavidades de acesso foram seladas com resina composta fotopolimerizável (3M Dental Products, St Paul, MN, USA). Depois de 30 dias de medicação intracanal (S4), os canais foram assepticamente acessados, sob isolamento absoluto, de acordo com o protocolo para a desinfecção como anteriormente descrito. Ca (OH)₂ foi removido com uma limaK#40 contra as paredes laterais do canal radicular e irrigação abundante com 10 mL de solução salina. Em seguida, novas coletas foram realizadas (S4).

Antes de obturação, instrumentação final do canal radicular foi realizada com a utilização de três instrumentos maiores do que o diâmetro apical obtido após PQM. Este procedimento foi associado com o protocolo de irrigação para

cada grupo. Após, todos os canais radiculares foram irrigados com sua respectiva solução neutralizadora. Os canais foram irrigados com 3 ml de EDTA 17% durante 3 minutos, seguido por uma lavagem final com 10 mL de solução salina estéril / apirogênica. A seguir os canais foram novamente coletados (S5).

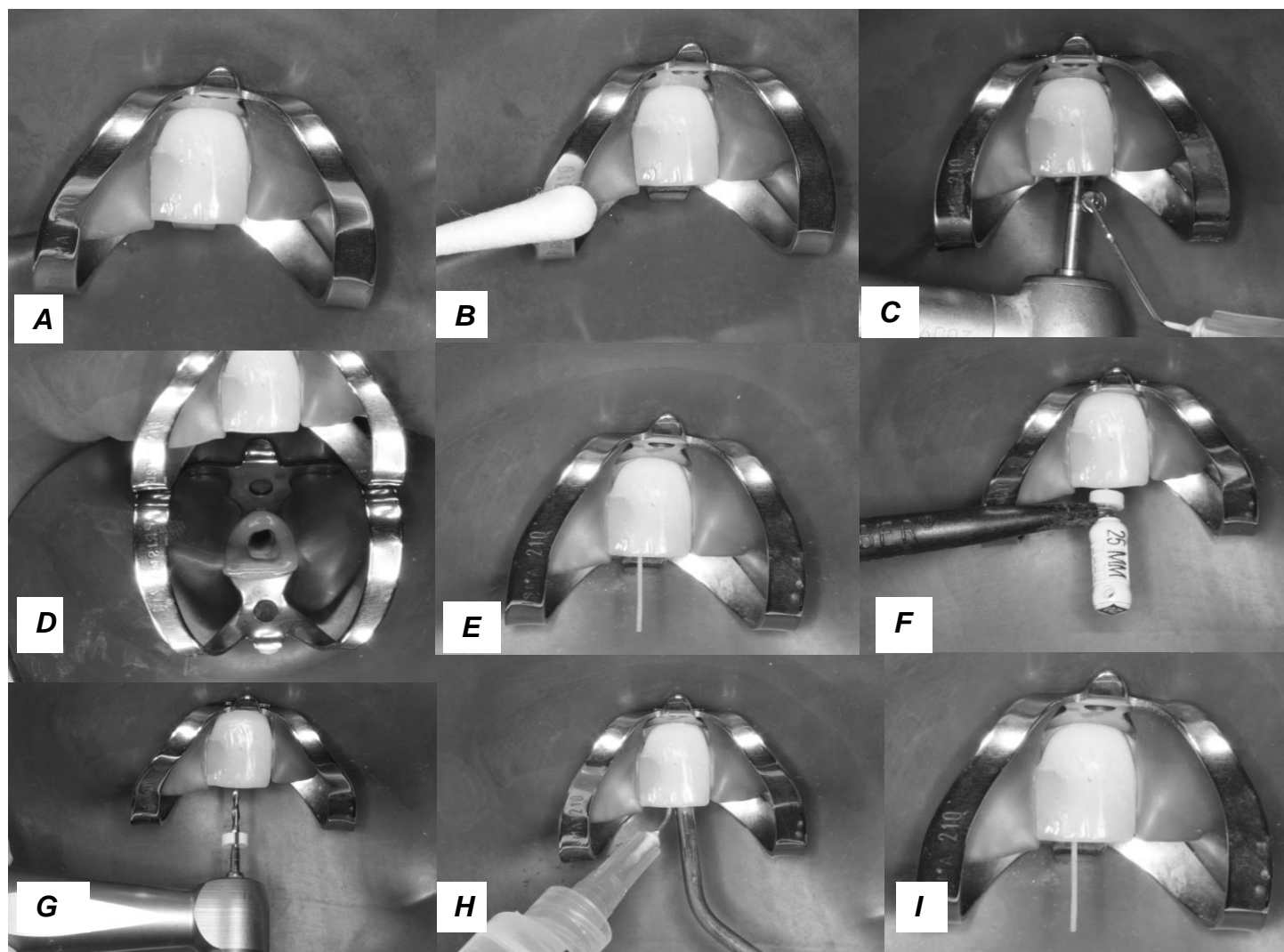


Figura 3- Procedimentos clínicos e coletas endodônticas. A- Isolamento absoluto; B- Descontaminação do campo operatório; C, D- Abertura coronária; E- Coleta Inicial; F- Odontometria eletrônica; G- Instrumentação rotatória Mtwo®; H- Irrigação/Aspiração do canal radicular; I- Coleta após PQM, EDTA 17%, após remoção da MIC e após novo toailete com EDTA 17%.

Processamento Laboratorial das amostras

Investigação e quantificação de endotoxinas- Teste cinético turbidimétrico (Pyrogen[®]-5000, Lonza, Walkersville, MD, EUA)

Para quantificação de endotoxinas presentes em 30 dentes com infecção endodôntica primária e lesão periapical foi utilizado o método turbidimétrico Pyrogen[®]-5000[®] (Lonza, Walkersville, MD, EUA) de LAL. Por meio deste, foi realizado um ensaio cinético quantitativo no qual a amostra foi colocada em contato com o reagente LAL reconstituído, em seguida incubada em um leitor de microplacas e monitorada automaticamente através de um software até o surgimento de turvação. O tempo necessário antes da ocorrência da turvação (Tempo de reação) é inversamente proporcional à quantidade de endotoxina presente na amostra.

O kit Pyrogen-5000[®] apresenta: 1) Pyrogen-5000[®] LAL Reagente; 2) Endotoxina padrão de *Escherichia Coli* (055:B5); 3) Tampão de reconstituição Pyrogen-5000. Além dos substratos provenientes do kit, também foram utilizados: 1) Água Reagente LAL (Lonza, Walkersville, MD, EUA); 2) Hidróxido de sódio 0.1 N ou Ácido clorídrico 0.1N, dissolvido em água reagente LAL, para ajuste do pH da amostra, se necessário; 3) Tubo de vidro descartável para diluição, isentos de endotoxina; 4) Ponteira estéreis descartáveis de 10 µL, 200 µL e 1000 µL; 5) Microplaca estéril descartável (Corning Costar, Cambridge, MA, UK); 6) Multipipetador de 8 canais; 7) Reservatório de reagente (Lonza, Walkersville, MD); 8) Leitor de microplacas (Ultramark, Bio-Rad Laboratories); 9) Software WinKQCL[®] (Lonza, Walkersville, MD); 10) Cronômetro e agitador vortex.

Para realização do teste, todo material utilizado proveniente da LONZA (WALKERSVILLE, MD, USA) estava apirogênico (livre de endotoxinas).

Padronização da Curva Padrão

O estabelecimento da curva padrão com concentrações conhecidas de endotoxinas é necessário para determinar a concentração de endotoxinas com quantidades desconhecidas. A curva-padrão é necessária para determinar a menor e a maior concentração de endotoxina presente na amostra, assim como os picos obtidos dentro da curva. Como um parâmetro para o cálculo da quantidade de endotoxinas em amostras de canais radiculares, a curva padrão foi obtida a partir da reconstituição do liofilizado de endotoxina oferecida pelo *kit* numa concentração conhecida de 100 EU/mL, onde suas diluições alcançam as concentrações finais de: 0,01, 0,1, 1, 10, 100 EU/mL de acordo com as instruções do fabricante.

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

1. Foi adicionado 0,1mL de 100 EU/mL endotoxina estoque em 0,9 ml de água para reagente LAL, resultando numa concentração de 10 EU/mL de endotoxina. Essa solução foi vigorosamente agitada em vórtex por pelo menos 1 minuto antes do procedimento;
2. Foi transferido 0,1mL 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. A solução foi vigorosamente agitada em vórtex por pelo menos 1 minuto antes do início do procedimento;
3. Foi transferido 0,1mL da solução de endotoxina 1 EU/mL em 0,9mL de água para reagente LAL para um recipiente adequado, resultando numa concentração de 0,10 EU/mL. Essa solução foi vigorosamente agitada em vórtex por pelo menos 1 minuto antes do procedimento.

4. Foi transferido 0,1 mL da solução de endotoxina 0,10 EU/mL em 0,9mL de água para reagente LAL para um recipiente adequado, resultando numa concentração de 0,01 EU/mL. Essa solução foi vigorosamente agitada em vórtex por pelo menos 1 minuto antes do início do procedimento.

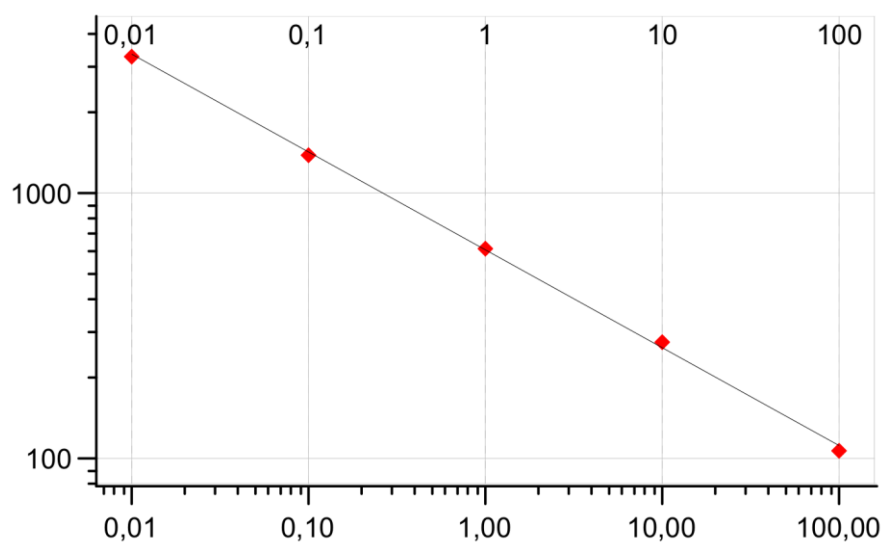


Figura 7. Exemplo de curva padrão para quantificação de endotoxinas em EU/mL.

Padronização das diluições das amostras

Os frascos de vidro contendo as amostras oriundas da instrumentação do canal radicular foram colocados em banho maria (37°C) por 30min. As amostras de endotoxina coletadas dos canais radiculares foram reconstituídas em 1 mL de água de LALe em seguida extraídas sob agitação mecânica em vortex por 60 segundos.

O teste LAL pode ser influenciado por muitos fatores. Fatores da inibição da detecção de endotoxina devem ser evitados, para isso foi realizada a adição de uma quantidade conhecida de endotoxina (0,1 EU/ml), em cada amostra, este procedimento é denominado “*Spike*”. Em seguida, os testes foram realizados em duplicata, sendo da mesma amostra - 2 poços contendo 100 µL da amostra mãe ou suas diluições; e 2 poços contendo 100 µL amostra + 0,1 EU/mL de endotoxina (*spike*). O teste foi realizado como descrito a seguir. Para comprovar que não houve qualquer tipo de interferência (inibição ou desenvolvimento) da amostra com o reagente de LAL, a concentração de endotoxina recuperada dos poços contaminados, calculada pelo software, deve estar entre 50% - 200%, valor este denominado controle positivo do produto (PPC). A amostra mãe e sua diluição 10^{-2} foram as que apresentaram maiores números dentro do padrão do PPC, então a diluição 10^{-2} foi selecionada para a realização dos testes de todas as amostras através do método turbidimétrico.

Plate Layout

Para quantificação da endotoxina presentes nas amostras foram utilizadas placas de culturas de células (96 poços – 12 colunas e 8 fileiras) (Corning Costar, Cambridge, MA) apirogênicas. Inicialmente, 100 µL do “blank” (água de LAL) foram inoculados em duplicata na placa. Em seguida, 100 µL de cada ponto da curva padrão nas diferentes concentrações (100 EU/mL, 10 EU/mL, 1 EU/mL, 0,10 EU/mL e 0,01 EU/mL) foi distribuído em duplicata. Após, 100 µL das amostras e seus respectivos controles (PPC) - ambos em duplicata foram inoculados com reagente de LAL. Para cada poço do controle positivo foi adicionado 10 µL de 0,1 EU/mL de endotoxina de *E. coli* (*spike*). A placa foi posicionada no leitor de ELISA (Ultramark, Bio-Rad Laboratories) e 100 µL do reagente de LAL foram adicionados em todos os poços.

De forma contínua durante todo o ensaio, o leitor de microplacas com Software WinKQCL[®] programado para - 340 nm, 37 ° C e 100 leituras - é monitorado na absorbância de 340nm de cada orifício da microplaca. Usando a leitura de absorbância inicial de cada orifício como seu próprio branco, o leitor determina o tempo necessário para que a absorbância aumente a 0.03 unidades. Este tempo é denominado Tempo de reação. O software WinKQCL executa automaticamente uma correlação linear log/log do Tempo de Reação de cada padrão com a concentração de endotoxina correspondente, levando aproximadamente 60 min para o término do teste e quantificação de endotoxinas nas amostras.

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

Figura 4. Distribuição das amostras: B= blank; D1= 0,01 EU/mL, D2= 0,10 EU/mL; D3= 1 EU/mL; D4= 10 EU/mL; D5= 100 EU/mL; A= Amostra; AC= Amostra Controle (Amostras contaminadas com concentração conhecida de endotoxina- Spike procedure).

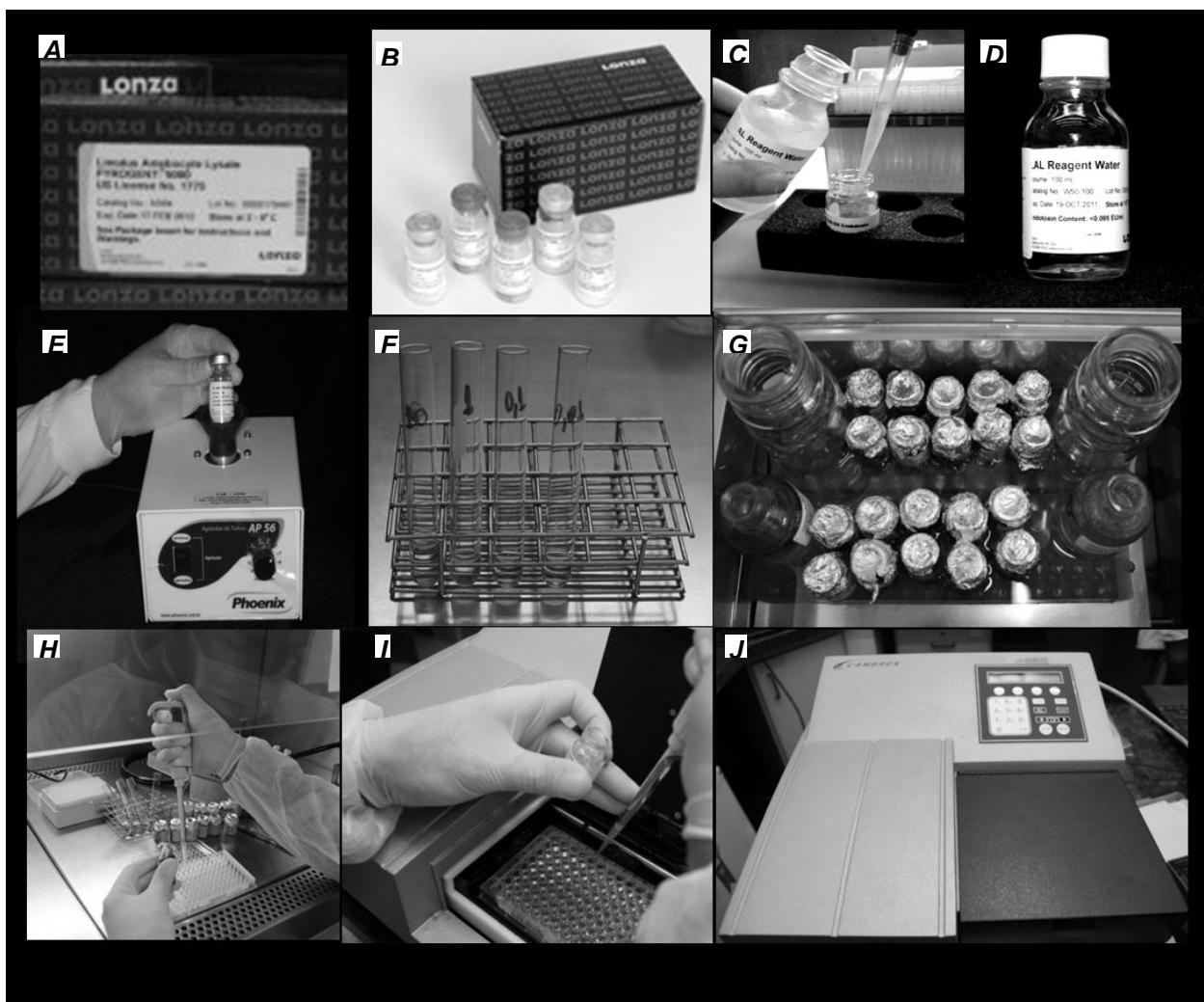


Figura 5. Ensaio cinético quantitativo para detecção de endotoxinas. **A, B** – Kit Pyrogen 5000; **C**- Reconstituição do Substrato de endotoxina; **D**- Água de LAL; **E**- Agitação mecânica em vórtex do substrato de endotoxina; **F**- Diluições seriadas para obtenção da curva padrão, **G**- Amostras em banho-maria; **H**- Preparo da placa; **I**- Inoculação do controle positivo (*Spike procedure*); **J**- Leitor Biotek.

Avaliação do potencial inflamatório do conteúdo endodôntico– Estimulação celular e dosagem de citocinas inflamatórias

Cultura Celular

Para avaliação do potencial inflamatório do conteúdo endodôntico em cultura de células, foi utilizada a linhagem imortalizada de macrófagos murinos (RAW 264.7) do Núcleo de Biologia Celular e Tecidual (NCT-Bio) da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas. As células foram mantidas em meio DMEM – Dulbecco's modified Eagle minimal essential medium supplemented (GIBCO) - enriquecido com 10% de soro fetal bovino inativado em calor, 100U/mL de penicilina e 100U/mL de estreptomicina (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) em placa de poliestireno de 100 mm (Corning Costar, Cambridge, MA). O meio de cultura foi trocado a cada 4 dias e as células mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂, até confluência de 90%. Em seguida, as células foram suspensas em solução de tripsina-EDTA 0,25% (Invitrogen, Carlsbad, CA). A contagem de células viáveis foi realizada através da câmara de Neubauer, utilizando o teste de exclusão de azul de tripan.

Estimulação celular

Um total de 10⁴ macrófagos viáveis foram colocados em cada poço da placa de poliestireno de 6 poços, acrescentando meio para cultura DMEM enriquecido com 10% de soro fetal bovino e 100U/mL de antibiótico até obter o volume final de 1000 µL. As placas foram mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ durante 48 horas. Previamente à estimulação com o conteúdo do canal, as células foram desinduzidas por 8h em meio de cultura (DMEM) contendo 0,3% de soro fetal bovino, com finalidade de sincronizar o ciclo celular e reduzir a influência dos componentes do soro fetal nas células.

Em seguida, os macrófagos foram estimulados com 60 μ L da amostra coletada do conteúdo endodôntico reconstituída em água de LAL e posteriormente mantidos em estufa a 37°C com 5% de CO₂. As amostras foram inoculadas em duplicata por um período de 24 horas, período suficiente para desencadear uma resposta imunológica celular ao conteúdo endodôntico, com consequente liberação de mediadores químicos inflamatórios (Martinho *et al.*, 2010).

Nesta fase da pesquisa, foram realizados dois grupos controles (positivo e negativo). No grupo controle positivo, as células foram estimuladas com uma concentração conhecida de endotoxina (10 EU/mL), e no grupo controle negativo, as células foram distribuídas nos poços sem, no entanto, receberem nenhuma estimulação por endotoxina ou alíquota proveniente do conteúdo endodôntico.

Após 24 horas, os sobrenadantes foram coletados utilizando pipeta de 1000 μ L com ponteiros plásticos estéreis e armazenados em tubos plásticos estéreis de 1.5 mL, congelados a -80°C para posterior quantificação de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , TNF- α).

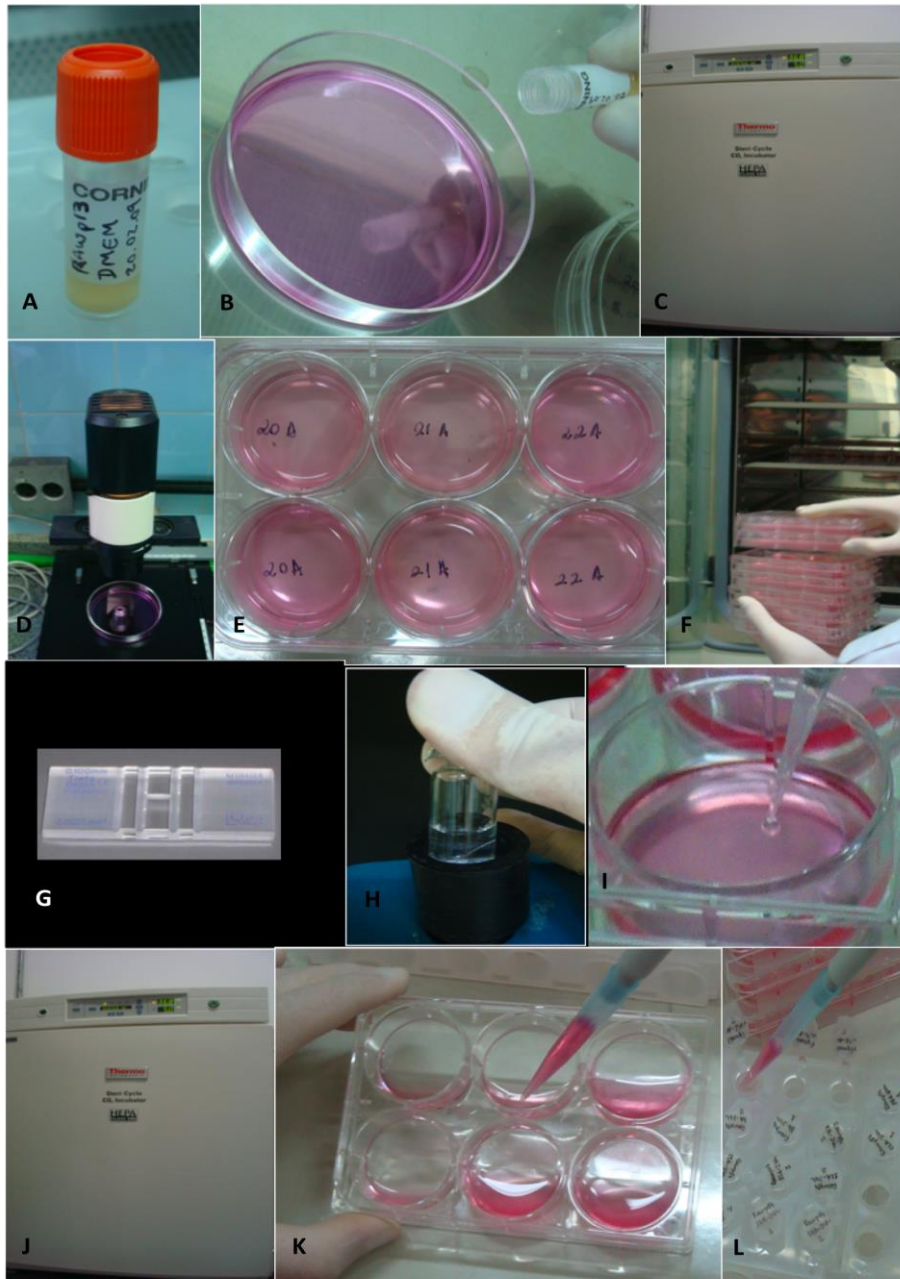


Figura 6 – Crescimento/ estimulação celular - A. Células congeladas (macrófagos RAW 264.7); **B.** Inoculação em meio DMEM + penicilina + Streptomicina + Soro fetal bovino; **C.** Incubação em estufa 5% CO₂ a 37° C; **D.** Verificação do crescimento celular até confluência de 90%; **E.** Distribuição celular em placa de 6 poços; **F.** Crescimento celular durante 48 horas (10^4 macrófagos) em estufa de CO₂ a 37° C. **G.** Contagem celular em câmara de Neubauer; **H.** Agitação em vortex do conteúdo endodôntico; **I.** Estimulação celular com 60 μ L conteúdo endodôntico; **J.** Incubação em estufa de CO₂ a 37° C durante 24 horas; **K.** Coleta do sobrenadante; **L.** armazenamento em tubo plástico.

Quantificação de citocinas inflamatórias IL-1 β , TNF- α , (Teste imunoenzimático – ELISA)

A produção de IL-1 β e TNF- α após estimulação por conteúdo endodôntico e controle positivo foram avaliadas por ensaios imunoenzimáticos (ELISA- (Enzyme-linked immuno sorbent assay) utilizando os Kits DuoSet[®] ELISA Development System (R&D Systems, Minneapolis, USA).

TESTE IMUNOENZIMÁTICO (ELISA)- TÉCNICA SANDUÍCHE

Nesse método, o anticorpo de um antígeno particular é, inicialmente, adsorvido no poço da placa. Depois, o antígeno é adicionado e se liga ao anticorpo (AC). Em seguida, um segundo e diferente anticorpo ligado à enzima é adicionado (anticorpo biotilado). Na sequência, é adicionado estreptovidina conjugada a peroxidase, onde a estreptovidina irá se ligar na biotina do AC secundário e a porção peroxidase ficará exposta para reagir com o substrato cromogênico. É então, adicionado o substrato cromogênico [(solução A (H₂O₂) + Solução B (Tetrametilbenzodina – TMB)], no qual, a H₂O₂ será quebrada pela peroxidase em H₂O + ½ O₂. Por sua vez, o O₂ irá agir sobre o TMB, passando de incolor para coloração azul. E finalmente, é adicionado uma solução de parada “stop solution” (2 N H₂SO₄), tornando a reação amarela, e permitindo a mensuração da quantidade de antígeno presente na amostra, de acordo com a intensidade da cor amarela lida em espectrofotômetro, numa densidade óptica (DO) de 450 nm. A presença de produto colorido indica a presença de antígeno. Trata-se de um método eficiente, pois permite detectar quantidades de proteína da ordem de nanogramas (10⁻⁹ g).

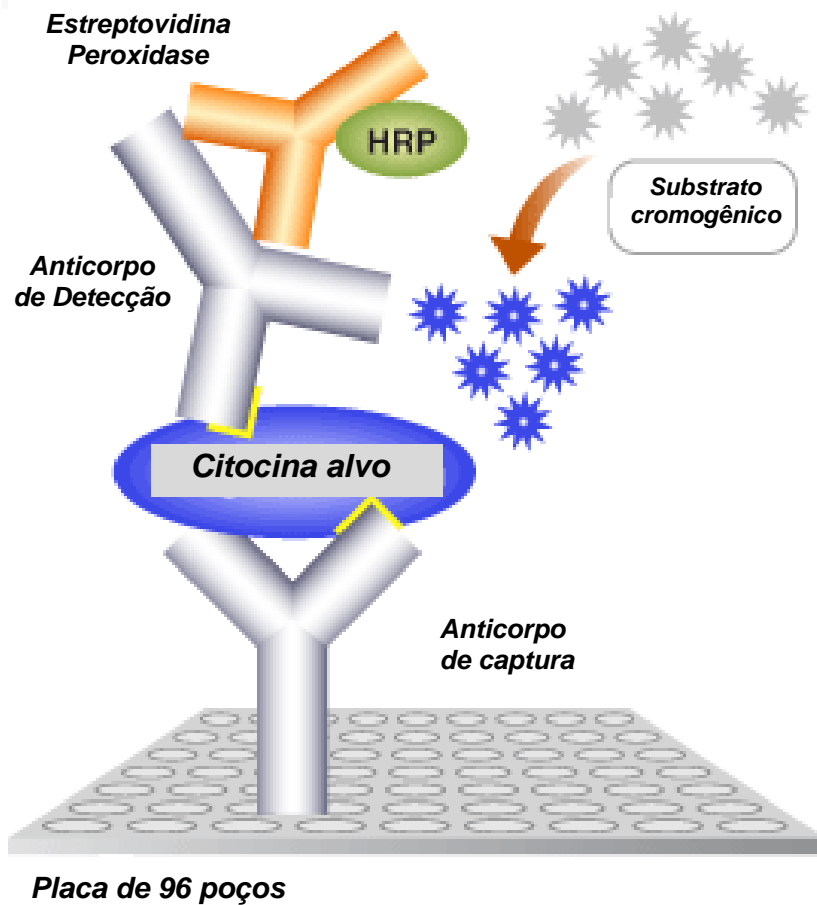


Figura 7. Esquema ilustrativo da técnica ELISA sanduíche.

Kit Duo-set (R&D System, Minneapolis, EUA)

O kit Duo-set apresenta: 1) Anticorpo de captura; 2) Anticorpo detecção biotinilado; 3) Padrão; 4) Streptavidina conjugada com peroxidase (*Streptavidin-Horseradish-peroxidase*).

Padronização da curva padrão

O estabelecimento de uma curva padrão com concentrações de citocinas inflamatórias conhecidas foi necessário para determinar a concentração de citocinas inflamatórias de amostras com quantidades desconhecidas.

Curva padrão para IL1- β

Esta curva foi realizada utilizando a solução concentrada do padrão (recombinante de IL1- β) 1000 pg/mL e suas diluições – 500 pg/mL(pg/mL), 250 pg/mL, 125 pg/mL e 62,5 pg/mL.

Curva padrão para TNF- α :

Esta curva foi realizada utilizando a solução concentrada do padrão (recombinante de TNF- α :) 2000 pg/mL e suas diluições – 1000 pg/mL, 500 pg/mL, 250 pg/mL, 125 pg/mL, 62,5 pg/mL e 32,2 pg/mL.

Procedimento laboratorial

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

Placas de microtitulação de 96 poços (*Corning Cell Culture Cluster*, Corning, EUA) foram sensibilizadas com anticorpo de captura anti- IL-1 β , anti- TNF- α de camundongo (100 μ L/ poço) de acordo com a recomendação do fabricante.

As placas foram mantidas *overnight* em temperatura ambiente, em seguida, foram lavadas 3 vezes com solução tampão de lavagem (PBS 0.05% de Tween 20) e bloqueados com 300 μ L de solução tampão de bloqueio (PBS com 1% de soro albumina bovina, BSA) por 1 hora em temperatura ambiente. Após, as placas foram novamente lavadas (3 vezes) com solução tampão de lavagem e incubadas com 100 μ L dos padrões de citocinas inflamatórias com concentrações conhecidas (curva padrão) e 100 μ L dos sobrenadantes da cultura de célula estimulados com conteúdo endodôntico durante 2 horas em temperatura ambiente. Todos realizados em triplicata.

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

Uma nova lavagem foi realizada, e a reação revelada utilizando 100 μ L de solução contendo substrato cromogênico e peróxido de hidrogênio em cada poço, e incubado por 20 minutos em temperatura ambiente, sendo a placa envolta em papel alumínio. Em seguida, foi adicionado 50 μ L do reagente de parada "Stop solution" em cada poço – ácido sulfúrico 2N. A densidade óptica (DO) de cada

poço foi determinada no leitor de microplacas com comprimento de onda de 450 nm.

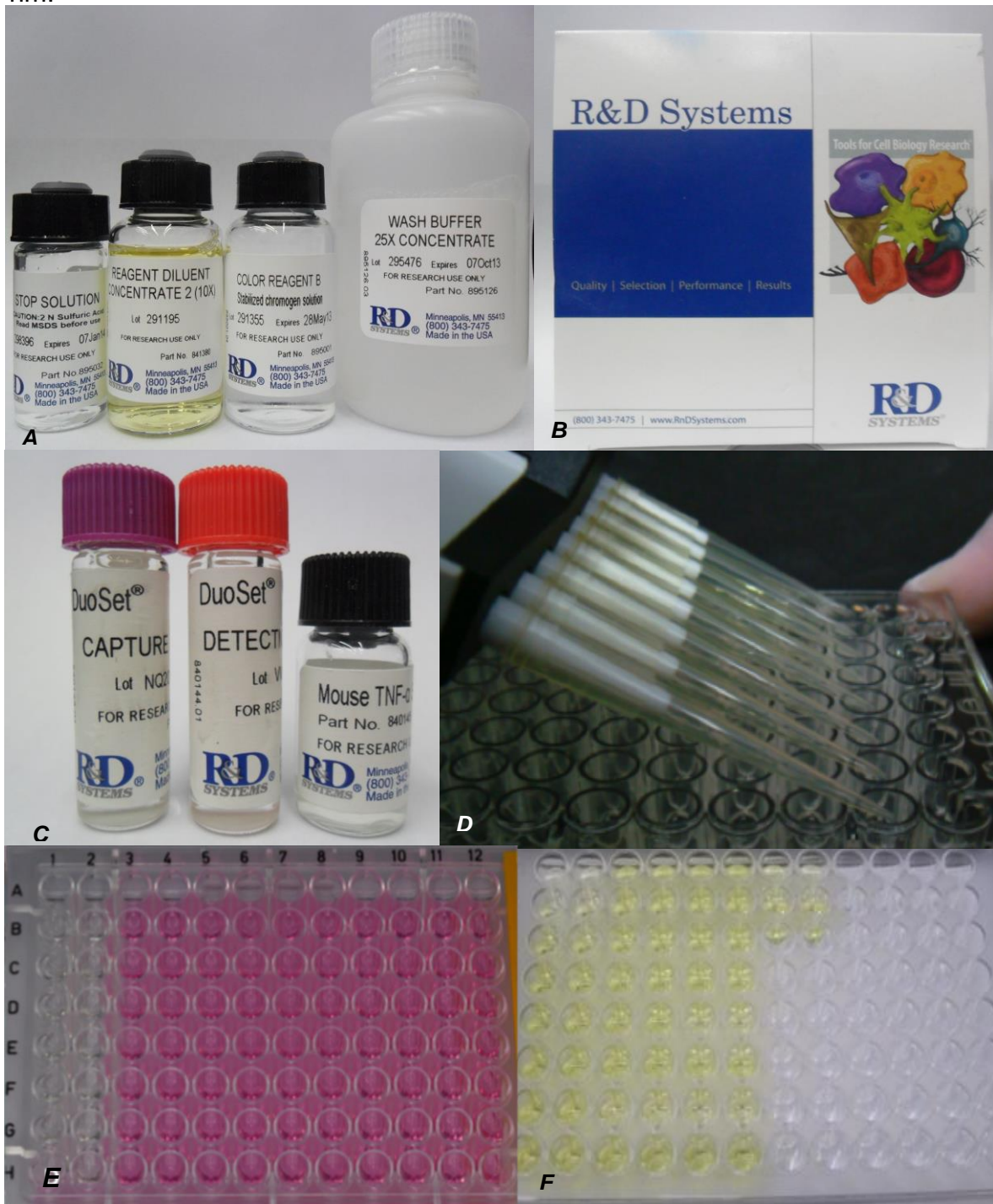


Figura 8. Kit Duo-set ELISA_ – **A. B** - Kit Duoset e reagentes; **C**- Anticorpo de captura, anticorpo de detecção e padrão; **D**- Sensibilização da placa com anticorpo de captura; **E**. Distribuição e incubação da placa com padrões e amostras; **F**- Revelação da reação com substrato cromogênico e peróxido de hidrogênio.

TABELA 1. Dados gerais dos 30 pacientes selecionados para realização do tratamento endodôntico

Paciente	Dente	Idade	Sexo	Sintomatologia	Dor percussão	Perc+ Palp	Dor palpação	Dor Prévia
P1	22	51	F	0	0	0	0	1
P2	22	18	F	1	1	1	1	0
P3	23	30	F	1	0	0	1	0
P4	21	15	F	0	0	0	0	1
P5	32	42	M	0	0	0	0	0
P6	11	29	M	1	1	1	1	0
P7	11	27	F	1	1	1	1	0
P8	21	29	M	1	1	0	0	1
P9	21	27	F	1	1	1	1	0
P10	12	35	M	0	0	0	0	1
P11	11	44	F	1	1	1	1	0
P12	12	44	F	1	1	1	1	0
P13	21	49	F	1	1	1	1	0
P14	11	25	M	0	0	0	0	1
P15	21	25	M	0	0	0	0	1
P16	21	30	F	0	0	0	0	1
P17	34	55	F	0	0	0	0	0
P18	35	52	F	0	0	0	0	1
P19	24	31	F	0	0	0	0	0
P20	12	39	M	0	0	0	0	1
P21	43	50	F	1	1	1	1	0
P22	12	44	M	0	0	0	0	1
P23	11	20	M	0	0	0	0	0
P24	13	40	F	1	1	1	1	1
P25	11	31	M	0	0	0	0	0
P26	22	36	F	0	0	0	0	0
P27	21	36	F	0	0	0	0	0
P28	11	47	F	1	1	0	0	1
P29	21	47	F	1	1	1	1	0
P30	21	36	F	0	0	0	0	1

0=ausente

1=presente

TABELA 2. Dados gerais e características clínicas dos casos selecionados para a pesquisa.

CASO	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS
P1	51 anos, gênero feminino, dente 12, unirradicular, assintomático, dor prévia, restauração insatisfatória, mobilidade, lesão periapical 5-9 mm, canal molhado, exsudato claro.
P2	18 anos, gênero feminino, dente 22, unirradicular, dor provocada, dor à percussão e à palpação, cariado, lesão periapical 5-9 mm, canal molhado, exsudato purulento, odor fétido.
P3	30 anos, gênero feminino, dente 23, unirradicular, dor provocada, dor a palpação, dente hígido, lesão periapical 1-4 mm, canal molhado, exsudato claro, odor fétido, fístula intra-oral.
P4	15 anos, gênero feminino, dente 21, unirradicular, assintomático, dor prévia, restauração deficiente, microinfiltração, lesão periapical 1-4 mm, canal seco.
P5	42 anos, gênero masculino, dente 32, unirradicular, assintomático, restauração deficiente, microinfiltração, lesão periapical 1-4 mm, canal molhado, exsudato claro.
P6	29 anos, gênero masculino, dente 11, unirradicular, dor provocada, dor à palpação e à percussão, restauração insatisfatória, lesão periapical 1-4mm, canal molhado, exsudato purulento.
P7	27 anos, gênero feminino, dente 11, unirradicular, dor provocada, dor à palpação e à percussão, restauração insatisfatória, lesão periapical 5-9 mm, canal molhado, exsudato claro.
P8	29 anos, gênero masculino, dente 21, unirradicular, dor provocada, dor à percussão, restauração insatisfatória, lesão periapical 1-4 mm, canal molhado, exsudato claro.
P9	27 anos, gênero feminino, dente 21, unirradicular, dor provocada, dor a palpação e à percussão, restauração insatisfatória, lesão periapical 1-4 mm, canal molhado, exsudato claro.
P10	35 anos, gênero masculino, dente 12, unirradicular, assintomático, dor prévia, restauração insatisfatória, lesão periapical 5-9 mm, canal seco.
P11	44 anos, gênero feminino, dente 11, unirradicular, dor provocada, dor à palpação e à percussão, restauração insatisfatória, lesão periapical 1-4mm, canal molhado, exsudato claro.
P12	44 anos, gênero feminino, dente 12, unirradicular, dor provocada, dor a palpação e à percussão, dente hígido, lesão periapical 1-4mm, canal molhado, exsudato claro, fístula intra-oral.
P13	49 anos, gênero feminino, dente 21, unirradicular, dor provocada, dor à palpação e à percussão, cariado, lesão periapical 1-4 mm, canal seco.
P14	25 anos, gênero masculino, dente 11, unirradicular, assintomático, dor prévia, restauração deficiente, microinfiltração, lesão periapical 1-4 mm, canal seco.
P15	25 anos, gênero masculino, dente 21, unirradicular, assintomático, dor prévia, restauração deficiente, microinfiltração, lesão periapical 1-4 mm, canal seco, fístula intra-oral.
P16	21 anos, gênero feminino, dente 21, unirradicular, assintomático, dente hígido, lesão periapical 1-4 mm, canal seco, fístula intra-oral.
P17	55 anos, gênero feminino, dente 34, unirradicular, assintomático, cariado, lesão periapical 1-4 mm, canal seco.
P18	52 anos, gênero feminino, dente 35, unirradicular, assintomático, dor prévia, cariado, lesão periapical 1-4 mm, canal seco.
P19	31 anos, gênero feminino, dente 21, unirradicular, assintomático, dente hígido, lesão periapical 1-4 mm, canal seco.

P20	39 anos, gênero masculino, dente 12, unirradicular, assintomático, restauração deficiente, microinfiltração, lesão periapical 5-9 mm, canal molhado.
P21	50 anos, gênero feminino, dente 43, unirradicular, dor provocada, dor a palpação e à percussão, restauração satisfatória, lesão periapical 1-4 mm, canal seco.
P22	44 anos, gênero masculino, dente 12, unirradicular, dor provocada, dor a palpação e à percussão, restauração deficiente, lesão periapical 5-9mm, canal molhado, exsudato purulento, odor fétido.
P23	20 anos, gênero masculino, dente 11, unirradicular, assintomático, dente hígido, lesão periapical 1-4 mm, canal seco.
P24	40 anos, gênero feminino, dente 13, unirradicular, dor provocada, dor à percussão, restauração insatisfatória, lesão periapical 5-9 mm, canal molhado, exsudato purulento.
P25	31 anos, gênero masculino, dente 11, unirradicular, assintomático, dente hígido, lesão periapical 1-4 mm, canal seco.
P26	36 anos, gênero feminino, dente 22, unirradicular, assintomático, restauração deficiente, microinfiltração, lesão periapical 5-9 mm, canal seco.
P27	36 anos, gênero feminino, dente 22, unirradicular, assintomático, restauração deficiente, microinfiltração, lesão periapical 1-4 mm, canal seco
P28	47 anos, gênero feminino, dente 11, unirradicular, assintomático, restauração deficiente, microinfiltração, lesão periapical 1-4 mm, canal molhado, exsudato purulento.
P29	47 anos, gênero feminino, dente 21, unirradicular, dor provocada, dor à palpação e à percussão, restauração deficiente, microinfiltração, lesão periapical 5-9 mm, canal molhado exsudato claro.
P30	36 anos, gênero feminino, dente 21, unirradicular, assintomático, restauração deficiente, microinfiltração, lesão periapical 5-9 mm, canal molhado, exsudato purulento.

TABELA 3 – Níveis de LPS (EU/mL), IL1- β (pg/mL) e TNF α (pg/mL) dos 30 casos com necrose pulpar e presença de lesão periapical nas diferentes etapas da terapia endodôntica (azul- NaOCl; rosa- CHX; verde- Soro fisiológico)

PACIENTE	LPS (S1)	LPS (S2)	LPS (S3)	LPS (S4)	LPS (S5)	IL1 B (S1)	IL1B (S2)	IL1B (S3)	IL1B(S4)	IL1B (S5)	TNF (S1)	TNF (S2)	TNF (S3)	TNF (S4)	TNF (S5)
P1	20,4	0,19	0,03	0,01	0,001	47,11	7,93	6,44	4,78	0,33	1016,79	387,91	381,02	104,58	77,58
P2	82,1	0,04	0,17	0,01	0,001	39,23	6,54	6,67	5,94	2,89	877,21	483,52	432,18	158,44	82,32
P3	31,4	0,01	0,09	0,03	0,001	31,09	8,23	8,93	5,98	2,12	964,03	416,32	402,18	205,98	64,1
P4	12	0,1	0,03	0,01	<0,01	42,37	9,38	9,24	6,76	3,78	1021,58	411,02	400,38	246,85	63,84
P5	16,2	0,17	0,01	0,01	0,001	40,32	8,12	8,09	6,8	0,67	1035,97	399,03	387,19	165,54	97,61
p6	14,6	0,05	0,11	0,01	0,001	23,12	12,35	11,22	8,61	5,43	1016,79	373,48	362,02	129,61	85,53
p7	31,2	0,11	0,18	0,01	0,001	28,72	11,32	11,00	7,89	3,74	1040,76	345,40	342,03	107,39	53,64
p8	72,2	0,24	0,1	0,01	0,001	27,31	4,19	3,74	2,45	1,07	1024,58	390,10	390,02	232,45	69,57
p9	44	0,01	0,01	0,01	<0,01	23,02	9,02	8,79	5,86	2,32	882,49	428,19	411,38	216,21	32,72
p10	28	0,01	0,21	0,02	0,001	29,57	8,33	6,32	4,87	2,71	959,23	417,00	412,07	196,87	52,71
P1	23,9	0,61	0,53	0,1	0,01	22,09	8,04	7,91	5,98	2,03	983,03	342,04	339,02	126,48	72,53
P2	73,7	0,89	0,51	0,01	<0,01	57,31	10,23	10,14	8,67	4,8	921,12	479,03	470,02	238,69	84,18
P3	0,81	0,56	0,01	0,01	<0,01	33,15	6,32	2,22	1,92	0,21	994,00	423,11	418,21	111,93	60,51
P4	1,24	0,55	0,06	0,01	<0,01	37,44	6,14	5,04	5,36	4,72	1028,79	473,04	463,02	235,36	24,52
P5	9,82	0,66	0,44	0,1	0,001	43,29	1,02	1,09	0,74	0,77	1012,14	683,74	593,15	202,74	50,47
P6	24,2	0,02	0,01	0,1	0,001	42,74	7,03	7,00	5,61	2,21	1011,17	483,19	481,02	234,01	82,62
P7	44,7	1,84	1,88	0,01	0,001	48,92	9,04	8,15	5,49	4,79	994,02	532,04	530,47	125,09	74,69
P8	11,7	0,67	0,47	0,7	0,001	22,03	5,41	4,08	1,45	0,07	907,23	511,02	499,06	110,45	80,7
P9	60,3	0,44	0,06	0,01	0,01	38,18	3,02	2,93	2,85	4,22	921,05	403,14	402,37	145,25	94,32
P10	13,4	1,8	0,77	0,09	0,01	28,02	8,98	8,00	6,3	1,76	878,12	379,00	373,15	126,30	51,16
P01	43,7	0,16	0,01	0,01	<0,01	89,50	41,35	34,55	21,23	7,93	938,22	791,687	618,09	625,53	201,90
P02	2,3	0,28	0,15	0,01	0,001	35,91	31,70	10,34	12,98	6,54	882,71	721,622	522,87	614,57	101,20
P03	3,31	0,12	0,03	0,01	0,001	29,78	27,11	23,76	15,87	8,23	902,65	623,45	622,58	214,61	126,70
P04	31,8	0,11	0,09	0,01	0,001	56,98	38,65	34,29	36,19	9,38	739,48	515,93	417,64	336,21	203,04
P05	9,2	0,14	0,16	0,01	0,001	64,73	33,47	19,48	12,23	8,12	902,33	720,34	724,97	512,13	175,80
P06	0,16	0,1	0,01	0,01	<0,01	33,18	18,02	15,02	13,65	7,35	993,174	587,036	593,05	213,95	186,80
P07	4,5	0,04	0,11	0,03	<0,01	23,78	16,13	16,00	10,07	5,32	981,093	623,115	611,12	410,97	158,30
P08	18,7	0,52	0,31	0,04	0,05	39,82	21,38	20,91	9,76	4,19	1023,143	739,036	697,00	469,16	83,26
P08	72,6	0,21	0,06	0,04	0,01	36,07	31,71	27,09	22,34	9,02	986,024	602,598	601,76	222,04	93,50
P10	171	40,4	16,8	0,95	0,1	27,33	20,09	20,00	15,89	8,33	989,237	512,737	500,05	315,89	142,90

ARTIGO 4

Crescimento bacteriano

Fusobacterium nucleatum ATCC 25586 foram cultivados em 200 mL do meio TYHK consistindo em 40 mg·mL⁻¹ de caldo de soja (Becton Dickinson, Sparks, EUA), 5 mg·mL⁻¹ de extrato de levedura (Becton Dickinson, Sparks, EUA) e 1-1 µg·mL de vitamina K3 (menadiona) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). O meio TYHK foi esterilizado em autoclave, seguido pela adição de hemina, esterilizada por meio de filtro (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) a uma concentração final de 1µg·mL⁻¹. Culturas puras de *F. nucleatum* foram cultivadas em câmara de anaerobiose (5% de H₂, 5% de CO₂, 90% N₂) e mantida a 37°C durante 48 h. A turvação do meio durante o período de incubação indicou o crescimento bacteriano. Após o período de incubação, a pureza das colônias foi confirmada morfolologicamente em placas de ágar TYHK, coloração de Gram e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR 16SDNA). Foram realizadas medições diárias da densidade óptica a 540 nm. A densidade óptica das suspensões celulares foi padronizada e equivalente a $\pm 2,0$ (Figura 9).

Exposição bacteriana às substâncias químicas auxiliares, pasta de hidróxido de cálcio e associações de substâncias

O total de 200 ml da cultura bacteriana foi centrifugado a 7000 rpm, a fim de obter o *pellet* bacteriano. Posteriormente, o *pellet* foi lavado com água estéril/apirogênica, em seguida, individualmente dividido em alíquotas de 14 mL em tubos de ensaio. Após nova centrifugação, foi realizado o descarte do sobrenadante e cada tubo teve o *pellet* re-suspenso em diferentes substâncias químicas selecionadas entre as mais comumente utilizadas na terapia endodôntica:

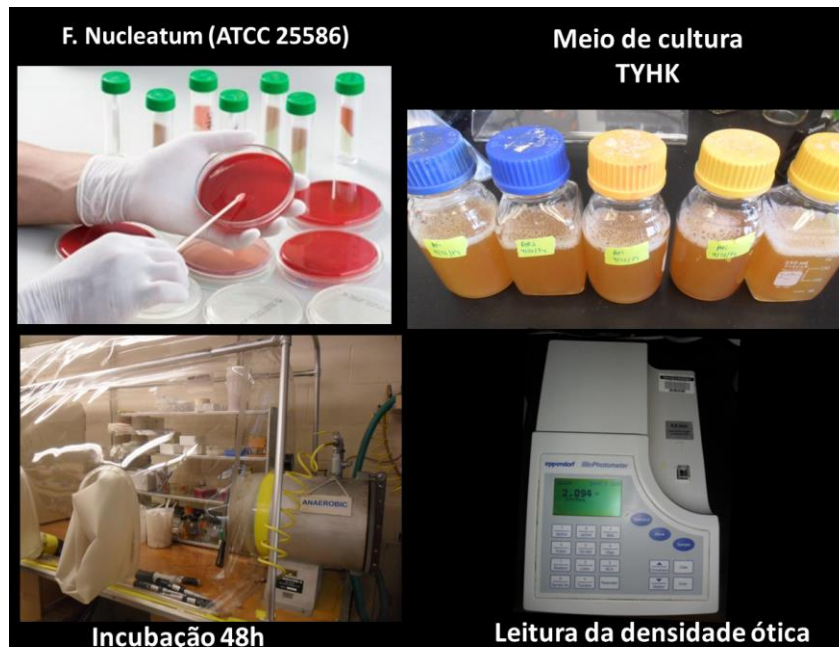


Figura 9. Cultivo bacteriano *F. nucleatum* ATCC 25586.

- **Substâncias químicas auxiliares (SQA):** hipoclorito de sódio (NaOCl) 5,25%, hipoclorito de sódio 2,5%, hipoclorito de sódio 1%, clorexidina (CHX) 2% gel [gel base: 1% de Natrosol (base de hidroxietilcelulose)] e líquida e ácido etilenodiaminotetra-acético (EDTA) 17%. Todas as substâncias foram preparadas 24 h antes do início do experimento. Um total de 5 ml de cada substância foi transferido para tubos de ensaio individuais contendo o pellet bacteriano e mantidos a 37°C durante 1 h. Para caracterizar o controle, o pellet foi suspenso em 5 mL de solução salina estéril / apirogênica (substância controle).

- **Pasta de hidróxido de cálcio [(Ca(OH)₂)] –veículo gel à base de celulose** (PulpDent Multical- Pulpdent Corporation, MA, EUA): Um total de 1 ml da pasta de Ca(OH)₂ foi transferido para tubos de ensaio individuais contendo o pellet bacteriano e mantidos a 37 ° C por diferentes períodos de incubação: 1 h, 24 h, 7,

14 e 30 dias. Todos os tubos de ensaio foram agitados diariamente por 5 minutos para assegurar a completa mistura com o sedimento bacteriano.

- **Associações de substâncias:** Tubos de ensaio contendo o pellet bacteriano foram tratados por diferentes protocolos: a) NaOCl 2,5% durante 1 h, seguido pelo toailete com EDTA 17% por 3 min, e finalmente pela pasta de Ca(OH)₂ por 7 dias; b) CHX gel 2% durante 1 h, seguido pelo toailete com EDTA 17% por 3 min, e finalmente pela pasta de Ca(OH)₂ por 7 dias.

Após o tratamento do pellet com todas as substâncias testadas, os tubos foram centrifugados a 11000 rpm. Por sua vez, o pellet foi lavado duas vezes com 10 mL de água estéril/apirogênica, a fim de eliminar resíduos das substâncias químicas. Para a associação de substâncias, cada substância foi completamente removido por centrifugação e, em seguida, uma lavagem do pellet foi realizada com 10 ml de água estéril/apirogênica antes da colocação da consecutiva substância, tal como anteriormente descrito. Após, os pellets tratados foram submetidos individualmente ao isolamento de LPS (Figura 10).

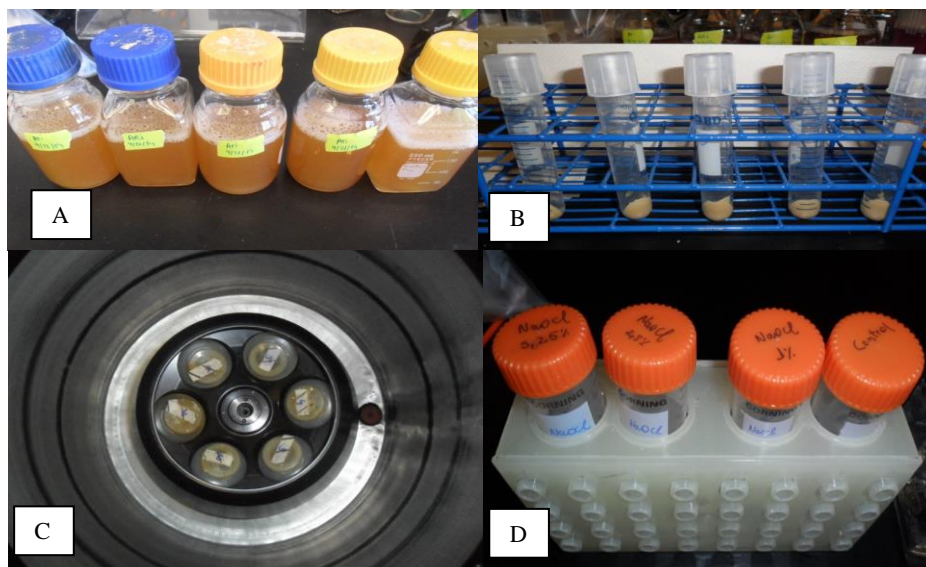


Figura 10. Tratamento das células bacterianas com substâncias químicas auxiliares.

Isolamento de LPS

LPS foi isolado utilizando o protocolo TRI-Reagente como previamente descrito (Al-Qutub et., 2006). O pellete foi re-suspenso em 1 mL de TRI-Reagente (MRC #TR118), uma preparação comercial de fenol e tiocianato de guanidina. Foi adicionado 1 mL de clorofórmio e a mistura foi centrifugada durante 10 min a 12000 rpm numa microcentrífuga padrão. A partir de então foi obtida uma mistura bifásica, no qual a camada mais superior da mistura foi mantida e a inferior descartada. Água estéril/apirogênica foi usada para re-extrair a mistura por duas vezes. As fases superiores foram liofilizadas para produzir o "LPS bruto".

Em seguida, o LPS liofilizado foi lavado com $MgCl_2$ 0,375 em EtOH a 95% e centrifugado a 4 °C a 5000 rpm durante 5 min. Posteriormente, o LPS foi lavado três vezes com 95% de EtOH frio seguido por uma lavagem final com EtOH frio a 100%. Após secagem, o LPS foi submetido à extração de Folch modificado para remover contaminantes fosfolípidicos. Resumidamente, o LPS foi resuspenso em reagente de Folch 1% (razão 2: 1 de clorofórmio: MeOH), centrifugado a 4 °C a 10000 rpm durante 5 min, e seco. O produto final foi re-suspenso em água e considerado como "LPS purificado".

Purificação de lipídeo A

A purificação de lipídeo A foi realizada por meio de hidrólise ácida suave, tal como descrito anteriormente (Curtis et al., 2011). Resumidamente, 500 mL de SDS a 1% em acetato de sódio 10 mM (pH 4,5) foi adicionado a 1 mg de LPS purificado e incubado a 100 °C durante 1 h. Posteriormente, a solução foi congelada e liofilizada. Em seguida, o material seco foi re-suspenso em 100 uL de água estéril/apirogênica e 1 mL de EtOH acidificado a 95% (feita por adição de 100 mL de HCl 4 N em 20 mL de EtOH a 95%) e centrifugado a 4 °C a 5000 rpm durante 5 min. O sobrenadante foi descartado, e o lipídeo A lavado três vezes com EtOH a 95% frio. Quatro lavagens foram repetidas, seguida por uma lavagem final

com EtOH a 100% frio. O lípido purificado A foi em seguida, seco e utilizado para a análise de MALDI-TOF.

A análise estrutural do lípido A pela técnica Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS)

Amostras de lípido A, correspondentes à cada tratamento, foram dissolvidas em 10 μ L de uma solução contendo uma matriz de 5-cloro-2-mercaptobenzotiazole (20mg·mL⁻¹), dissolvido em uma mistura de clorofórmio/metanol 1: 1 (V / V). Um total de 0,5 μ L de cada amostra foi disposta sobre uma placa alvo de MALDI-TOF. Após a co-cristalização da matriz da amostra, obtido por secagem de ar à temperatura ambiente, as amostras foram analisadas pelo modo de íon- negativo num analisador AUTOFLEX (Bruker Daltonics Inc., Billerica, MA, EUA). A calibração do instrumento e todos os outros parâmetros de ajuste foram otimizadas utilizando o HP Calmix (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Os picos de íons detectados foram adquiridos com reposição de 50 Hz e 2.000 disparos para cada espectro. O perfil espectral para cada amostra foi suavizado e comparado à massa/carga (m/z) do lípido A tratado pela substância controle.

Análise estrutural do LPS pela técnica Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) e silver staining


Para comparar os padrões de LPS foi realizada eletroforese em gel (SDS-PAGE; 12% de gel de poliacrilamida) e posteriormente coloração com nitrato de prata de acordo com o método relatado por Tsai & Frasch (37). Um total de 0.67mg /ml de cada de LPS purificado foi utilizado por amostra no gel. O tampão consistiu em 0,025 M de Tris, 0,2 M de glicina, e 0,1% de SDS. Os géis foram corridos num Mini-Protein III (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) a uma corrente constante de 35 mA por gel utilizando o Power Pac 300 (Bio-Rad). Após

eletroforese, os géis foram oxidados em 50 ml de solução de fixação com 0,7% de ácido periódico em 30% de etanol (EtOH) e 10% de ácido acético (HAc), durante 10 min. Em seguida, os géis foram lavados em 100 mL de água deionizada (DW) de 2 x 5 min, e então impregnados em 100 mL de 0,2% de nitrato de prata durante 10 minutos. Os géis foram lavados em 100 ml de DW durante 2 x 20s, e imersos em 100 mL de uma solução aquosa contendo 0,05% de formaldeído e 10% HAc por 5-8 min para revelar a imagem. Após a redução de íons de prata, os géis foram imersos em 10% HAc durante 1 min para parar revelação. Análise de bandas de LPS foi realizada utilizando um scanner de luz branca (UMAX olhar Power-2100XL, Umax Systems GmbH, Willich, Alemanha) ligado a um computador para a análise da intensidade das mesmas.


Análise da bioatividade do LPS: Ativação de TLR-4

Células Human embryonic kidney (HEK) 293 foram plaqueadas em placas de 96 poços a uma densidade de 4×10^4 células por poço e transfectadas no dia seguinte com plasmídeos portadores de luciferase, luciferase Renilla, TLR-4 e DM-2 e fosfato de cálcio padrão, como descrito por Jain et al. (2013) (23). Após crescimento *overnight* das células HEK 293 transfectadas (para permitir a expressão dos complexos de receptores TLR), os poços-teste foram estimulados em triplicatas durante 4 h com diferentes concentrações do LPS tratado por cada substância (1ug/ml, 10ug /mL, 100ug/mL e 1,000ug/ml) na presença de 10% de soro humano. Após a estimulação, as células HEK 293 foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato e lisadas com 50 ul de tampão de lise passiva (Promega, Madison, WI, EUA). A atividade de luciferase foi medida utilizando o ensaio Dual Luciferase Assay Reporter System (Promega) num Centro LB 960 Microplate Luminometer (Berthold Technologies GmbH & Co. KG, Bad Wildbad, Alemanha). Os dados foram expressos como atividade de NF-kB, que representa a razão da atividade da luciferase NF-kB-dependente com a atividade β -actina da luciferase Renilla promotora- dependente.

ANEXO I – Certificado de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Humana (Artigos 1 e 2).




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




CERTIFICADO

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

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



Prof. Dr. Livia Maria Andalo Tenuta
Secretária
CEP/FOP/UNICAMP



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

Nota: O título do protocolo aparece aqui fornecido pelos pesquisadores, em qualquer edição.
 Notice: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.

ANEXO II – Certificado de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Humana (Artigos 3 e 4).



**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 **"ESTUDO CLÍNICO DA COMUNIDADE MICROBIANA E DOS ASPECTOS IMUNOBIOLOGICOS ENVOLVIDOS NAS ALTERAÇÕES PULPARES E PERIRRADICULARES"**, protocolo nº 018/2014, dos pesquisadores Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes, Ariane Cássia Salustiano Marinho, Daniel Rodrigo Herrera Morante, Marlos Barbosa Ribeiro e Thais Mageste Duque, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 07/05/2014, com alterações em 10/09/2014.

The Ethics Committee in Research of the Piracicaba Dental School - University of Campinas, certify that the project **"CLINICAL STUDY OF THE MICROBIAL COMMUNITY AND IMMUNOBIOLOGIC ASPECTS INVOLVED IN THE PULP AND PERIAPICAL DISEASES"**, register number 018/2014, of Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes, Ariane Cássia Salustiano Marinho, Daniel Rodrigo Herrera Morante, Marlos Barbosa Ribeiro and Thais Mageste Duque, comply with the recommendations of the National Health Council - Ministry of Health of Brazil for research in human subjects and therefore was approved by this committee on May 07, 2014; with alterations on Sep 10, 2014.

Prof. Dr. Felipe Bevilacqua Prado
Secretário
CEP/FOP/UNICAMP

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

Nota: O título do protocolo aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição.
Notice: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.

ANEXO III- Biografia

Ariane Cassia Salustiano Marinho de Alencar, nascida em 06/ 08/ 1985 na cidade de Maceió, AL, Brasil.

2004-2008	Graduação em Odontologia Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Alagoas (FOUFAL).
2009-2011	Especilização em Endodontia Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade de Campinas (UNICAMP).
2009–2011	Estágio no Laboratório de Microbiologia aplicada à Endodontia, na Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade de Campinas (UNICAMP).
2011-2013	Mestrado em Clínica Odontológica (área Endodontia) Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade de Campinas (UNICAMP).
2013-2016	Doutorado em Clínica Odontológica (área Endodontia) Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade de Campinas (UNICAMP).
02/2014-10/2014	Estágio de Doutorado na School of Dentistry- University of Washington- Department of Periodontics, Seattle, WA, USA.

Lista de publicações página

<http://lattes.cnpq.br/1016218611944035>

ANEXO IV- Lista de publicações geradas pela tese

Marinho AC, Polay AR, Gomes BP. Accuracy of Turbidimetric Limulus Amebocyte Lysate Assay for the Recovery of Endotoxin Interacted with Commonly Used Antimicrobial Agents of Endodontic Therapy. J Endod. 2015; 41:1653-9. QUANTIDADE DE CITAÇÕES Google Scholar = 2

Marinho AC, Martinho FC, Leite FR, Nascimento GG, Gomes BP Pro-inflammatory activity of primarily infected endodontic content against macrophages after different phases of the root canal therapy. J Endod. 2015;41:817-23 QUANTIDADE DE CITAÇÕES Google Scholar=3

Marinho AC, Martinho FC, Gonçalves LM, Rabang HR, Gomes BP. Does the Reciproc file remove root canal bacteria and endotoxins as effectively as multifile rotary systems? Int Endod J. 2015; 48:542-8 QUANTIDADE DE CITAÇÕES Google Scholar =13

Marinho AC, Martinho FC, Zaia AA, Ferraz CC, Gomes BP. Monitoring the effectiveness of root canal procedures on endotoxin levels found in teeth with chronic apical periodontitis. J Appl Oral Sci. 2014;22:490-5 QUANTIDADE DE CITAÇÕES Google Scholar =5

Marinho ACS; Martinho FC; Zaia AA; Ferraz CCR; Almeida JFA; Gomes BPF. Influence of the apical enlargement size on the endotoxin level reduction of dental root canals. J Appl Oral Sci. 2012;20:661-6. QUANTIDADE DE CITAÇÕES (Google Scholar)= 16

Quantidade de citações recebidas na literatura científica internacional, segundo o ISI, Scopus ou Google Scholar: Citações Google Scholar- **69/ Fator H= 4**

ARTIGOS ENVIADOS PARA PUBLICAÇÃO

Marinho AC; To T, Darveau RP, Gomes BP. Detection and function of lipopolysaccharide and its purified lipid A after treatment with auxiliary chemical substances and calcium hydroxide dressings used in endodontic therapy. J Endod 2016.

ANEXO V – Texto para divulgação

Os microrganismos e seus fatores de virulência incluindo os lipopolissacarídeos (LPS) são os principais agentes causadores das infecções que acometem os canais radiculares. Estratégias clínicas devem voltar-se para a máxima desagregação/redução da carga microbiana, assim como para eliminação e/ou inativação dos LPS e demais produtos tóxicos, de maneira a reduzir o potencial inflamatório presente nestes canais a níveis compatíveis com o reparo dos tecidos perirradiculares.

Para detecção e quantificação de endotoxinas dos canais radiculares é utilizado o teste turbidimétrico Pyrogent 5000[®] (BioWhitaker, Inc, Walkersville, MD, USA) utilizando a técnica do *Limulus Amebocyte Lysate* (LAL). Sabe-se que os canais radiculares podem conter exsudatos com colorações diferentes (i.e. hemorrágico, purulento, claro, etc), assim como existem diferentes substâncias químicas auxiliares e medicações intracanalais. Desta maneira é importante validar se o método LAL não sofre interferência na presença de substâncias químicas auxiliares, medicações intracanalais e nas diferentes condições clínicas dos canais

radiculares, sendo este um dos objetivos do nosso trabalho. Tal validação foi inédita na literatura endodôntica.

O presente trabalho visou realizar a identificação/quantificação bacteriana, quantificação de endotoxinas e avaliação do potencial imunoestimulador do conteúdo infeccioso endodôntico para obter um maior entendimento da infecção endodôntica primária. Para tal foi utilizado técnicas de cultura e moleculares para detecção dos microrganismos; ELISA para quantificação de LPS e das citocinas pró-inflamatórias. A antigenicidade do conteúdo infeccioso (i.e. microrganismos + endotoxinas) presente nos canais radiculares foi testada contra macrófagos na produção de citocinas pró-inflamatórias.

Os avanços tecnológicos dos instrumentos trouxeram melhorias significativas na capacidade de instrumentação dos canais radiculares, com redução do tempo de trabalho e com menos complicações de procedimento. Diante das novas tecnologias para instrumentação dos canais radiculares faz-se necessário investigar seu real potencial na redução não apenas de microrganismos, mas também de seus fatores de virulência, incluindo o LPS. No presente estudo foi investigada a efetividade do sistema de instrumentação recíprocante de lima única, Reciproc R25, em comparação com sistemas rotatórios convencionais de limas múltiplas, na remoção de bactérias e endotoxinas de canais radiculares contaminados.

Entretanto mesmo as modernas tecnologias são ineficazes na instrumentação de todos os tipos de canais radiculares, deixando áreas que

podem abrigar biofilmes bacterianos residuais, que poderão ser fonte de infecção persistente. Isto enfatiza o papel chave do uso de agentes químicos antibacterianos durante o preparo químico-mecânico e da medicação intracanal, numa tentativa de suplementar os efeitos da limpeza mecânica. A integração de novas tecnologias de instrumentação e irrigação, juntamente com técnicas e substâncias químicas mais eficazes otimizam significativamente a prática clínica diária. Sendo assim buscou-se no presente trabalho monitorar “*in vivo*” a efetividade do preparo químico-mecânico (PQM) com NaOCl 2,5% e Clorexidina (CHX) gel 2% (tendo como controle o soro fisiológico [SS]), após o uso do EDTA 17% e uso do hidróxido de cálcio por 30 dias, como medicação intracanal, elucidando a contribuição de cada etapa da terapia endodôntica na redução de microrganismos e endotoxinas.

Baseados em nossos resultados, observamos que a combinação de instrumentação, substâncias químicas auxiliares, irrigação-aspiração e medicação intracanal tem papel acumulativo na redução do conteúdo endotóxico presente nos canais radiculares. Entretanto pouco se sabe a respeito da real ação química destas substâncias e das medicações intracanaís na molécula de LPS na ausência de fluxo- refluxo. É importante diferenciar habilidade de redução de LPS devido ao fluxo-refluxo dos irrigantes no interior do canal, do efeito químico da substância na degradação da molécula do LPS. Não está totalmente elucidado quão bioativo é o LPS após contato com as substâncias e medicamentos utilizados durante o tratamento endodôntico. Tal contato poderia afetar sua

estrutura, levando a um aumento/diminuição do estímulo necessário para a produção de citocinas pró-inflamatórias e ativação dos receptores TLR-4. Uma substância ou medicamento capaz de causar alteração na estrutura do LPS, diminuindo sua bioatividade, tem ação terapêutica importante, contribuindo para o sucesso do tratamento endodôntico. A bioatividade do LPS frente a diferentes substâncias químicas e medicação à base de hidróxido de cálcio na ausência do fluxo e refluxo da solução irrigadora foi testada com a espectrometria de massa (MALDI-TOF) e silver staining, e ativação dos receptores TLR-4. Tal avaliação foi inédita na literatura endodôntica e servirá de base para futuros trabalhos nesta linha.

Concluindo, estudos que utilizam pesquisa básica associada a ensaios clínicos como o presente, são necessários e devem ser realizados. Primeiramente para a atualização dos conhecimentos sobre os fatores microbiológicos, imunológicos, entre outros, presentes nos canais radiculares infectados, capazes de impedir o processo do reparo periapical. Depois para aplicar a tecnologia no aprimoramento do tratamento endodôntico, melhorando a qualidade técnica do tratamento e reduzindo não apenas o tempo de trabalho, mas também os níveis de microrganismos e seus fatores de virulência, acelerando conseqüentemente o processo de reparo dos tecidos perirradiculares. Com certeza a associação das ciências básicas com o desenvolvimento tecnológico aumentará as taxas de sucesso do tratamento endodôntico.