



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

LIDIANE MENDES LOUZADA

**Estudo clínico do perfil microbiológico, de LPS e de LTA em dentes
com vitalidade pulpar associados à doença periodontal**

Piracicaba

2019

LIDIANE MENDES LOUZADA

**Estudo clínico do perfil microbiológico, de LPS e de LTA em dentes
com vitalidade pulpar associados à doença periodontal**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba da Universidade
Estadual de Campinas como parte dos requisitos
exigidos para a obtenção do título de Mestra em
Clínica Odontológica, na Área de Endodontia.

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

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação
defendida pela aluna Lidiane Mendes Louzada e
orientada pela Profa. Dra. Brenda Paula Figueiredo de
Almeida Gomes

Piracicaba
2019

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

L939e Louzada, Lidiane Mendes, 1993-
Estudo clínico do perfil microbiológico, de LPS e de LTA em dentes com vitalidade pulpar associados à doença periodontal / Lidiane Mendes Louzada. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2019.

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

1. Bactérias. 2. Doenças periodontais. 3. Endodontia. 4. Lipopolissacarídeos. 5. Ácido lipoteicóico. 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: Clinical study of the microbial profile, LPS and LTA in teeth with pulp vitality associated with periodontal disease

Palavras-chave em inglês:

Bacteria

Periodontal diseases

Endodontics

Lipopolysaccharides

Lipoteichoic acid

Área de concentração: Endodontia

Títuloção: Mestra em Clínica Odontológica

Banca examinadora:

Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes [Orientador]

Luciano Tavares Ângelo Cintra

Caio Cezar Randi Ferraz

Data de defesa: 21-02-2019

Programa de Pós-Graduação: Clínica Odontológica

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-3480-8433>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/4210694393153677>



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 21 de Fevereiro de 2019, considerou a candidata LIDIANE MENDES LOUZADA aprovada.

PROF^a. DR^a. BRENDA PAULA FIGUEIREDO DE ALMEIDA GOMES

PROF. DR. LUCIANO TAVARES ÂNGELO CINTRA

PROF. DR. CAIO CEZAR RANDI FERRAZ

A Ata da defesa, assinada pelos membros da Comissão Examinadora, consta no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais **Paulo de Tarso Louzada, Cíntia Cristina Mendes Louzada** e ao meu irmão **Fábio Mendes Louzada**, que foram essenciais para a concretização desse sonho. Obrigada por estarem sempre presentes a todos os momentos, por serem meu porto seguro e minha fonte de amor inesgotável.

Obrigada pela paciência, ajuda e pelas orações na conquista de mais uma etapa. Vocês me ensinaram que ser feliz é reconhecer que vale a pena viver, apesar dos desafios e dificuldades.

Jamais existirão palavras que descrevam tudo o que representam para mim! Vocês são meus maiores exemplos de vida!

Amo muito vocês!

*“Ser profundamente amado por alguém nos dá força;
amar alguém profundamente nos dá coragem.”*

Lao-Tse

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, que foi meu maior abrigo e meu guia durante as dificuldades e surpresas da vida. Obrigada meu Deus, por ter me dado uma família maravilhosa, saúde e disposição. Por ter me protegido, ter me garantido serenidade, paciência e perseverança, abrindo-me as portas em todos os momentos em que precisava de luz. Obrigada por estar sempre em meu caminho e colocando ao meu lado pessoas que sempre ajudaram a me levantar nos momentos onde a queda fez parte do aprendizado em minha jornada. Por todas as graças concedidas, por saber que posso Te encontrar em todos os momentos de minha vida, por não permitir que desistisse nesta longa caminhada, por me manter sempre nos melhores caminhos: os Teus caminhos.

A toda a minha família pelo apoio e carinho que sempre tiveram comigo. Sou grata a todos pelo incentivo recebido ao longo destes anos nas minhas escolhas e decisões.

À minha orientadora, **Profa. Dra. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes**, que sempre admirei pela grande pessoa e profissional que é. Obrigada pelo incentivo e confiança depositada em mim para a elaboração desse trabalho. Aprendi com a Sra. que a maior dívida do professor é proporcionar ao aluno oportunidades que levam ao crescimento, assim sou eternamente grata por este crescimento que me proporcionou, pela oportunidade da convivência, além do privilégio de aprender dia-a-dia, seja na pesquisa, na clínica ou no meu crescimento pessoal. Minha eterna gratidão!

Ao meu melhor amigo, **Rodrigo Arruda Vasconcelos** por ser meu parceiro na pesquisa, durante os atendimentos e nos procedimentos laboratoriais. Obrigada por toda paciência, compreensão, alegrias e sonhos compartilhados! Sinto enorme orgulho e admiração por você e agradeço a Deus por ser um presente que a pós-graduação me deu! Obrigada por todas as vezes que me aconselhou, me dando forças para que eu conseguisse chegar até aqui. Você faz parte desta conquista!

Ao **Prof. Dr. Luciano Tavares Angelo Cintra**, pela oportunidade de conhecer e desvendar o meio científico na área de Endodontia durante a minha orientação na iniciação científica. Obrigada por ter confiado em mim e por ser um dos grandes

incentivadores e responsáveis pela idealização e realização desse sonho.

Aos **Professores da Área de Endodontia da FOP-UNICAMP**, **Profa. Dra. Adriana de Jesus Soares**, **Prof. Dr. Alexandre Augusto Zaia**, **Profa. Dra. Brenda Paula Figueiredo de Almeida**, **Prof. Dr. Caio Cezar Randi Ferraz**, **Prof. Dr. José Flávio Affonso de Almeida** e **Profa. Dra. Marina Angélica Marciano da Silva**, pelos conhecimentos transmitidos e agradável convivência.

A toda a **equipe da Endodontia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba FOA-UNESP**, **Eloi Dezan Junior**, **João Eduardo Gomes Filho**, **Luciano Tavares Angelo Cintra**, **Rogério de Castilho Jacinto** e **Gustavo Sivieri de Araújo**. Vocês são importantes na minha trajetória profissional e também são pessoas muito queridas.

À **Profa. Dra. Marina Angélica Marciano da Silva**, **Prof. Dr. Renato Corrêa Viana Casarin** e **Profa. Dra. Thais Mageste Duque**, **Prof. Dr. Alexandre Augusto Zaia** componentes da banca examinadora do Exame de Qualificação, pela contribuição a este trabalho.

Ao **Prof. Dr. Alexandre Augusto Zaia**, **Profa. Dra. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes** e **Prof. Dr. Luciano Tavares Angelo Cintra**, **Prof. Dr. Caio Cezar Randi Ferraz**, **Profa. Dra. Flaviana Bombarda de Andrade**, membros da comissão examinadora da defesa de dissertação de mestrado, pela disponibilidade, contribuição e atenção prestada a este trabalho.

À minha amiga **Francine Benetti** da FOA-UNESP, por todo o incentivo para que eu continuasse na busca dos meus sonhos e objetivos. Obrigado pela amizade e ajuda que você sempre me deu.

Aos meus colegas de Pós-Graduação da área de Endodontia: **Emelly de Aveiro**, **Ezequiel Gabrielli**, **Fernanda Yukari Takara**, **Jéssica Jeuken Teixeira**, **Lauter Eston Pelepenko Teixeira**, **Natalia Siqueira Lobo**, **Pabla Secchi**, **Ricardo Honda**, **Vito Madio Chiarelli Neto**, **Ana Carolina Correia Laurindo de Cerqueira Neto**, **Andréa Cardoso Pereira**, **Augusto Rodrigues Lima**, **Bruna Milaré Angelieri**,

Diogo Henrique da Silva, Eloá Cristina Bicego Pereira, Felipe Nogueira Anacleto, Flávia Medeiros Saavedra de Paula, Jaqueline Mafra Lazzari, Maria Cristina Coelho de Carvalho, Marina Carvalho Prado, Patrick Wilson Quellis Baltieri, Priscila Amanda Francisco, Rafaela Casadei Chapola e Rodrigo Arruda Vasconcelos, pelo companheirismo e amizade construída durante nosso convívio.

Ao **Maicon Ricardo Zieberg Passini, Ana Cristina Godoy, Maria Helídia Neves Pereira, Janaina Leite e André Fernando dos Santos**, funcionários da área de Endodontia, pelo carinho, amizade e disponibilidade em colaborar com todos.

Aos **alunos e professores da disciplina de Periodontia da FOP-UNICAMP**, pelos ensinamentos e por toda ajuda durante a realização da pesquisa.

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

À **Profa. Dra. Karina Gonzales Silvério Ruiz**, coordenadora geral dos cursos de Pós-Graduação e ao **Prof. Dr. Valentim Adelino Ricardo Barão**, coordenador do curso de Pós-Graduação em Clínica Odontológica.

Aos pacientes que participaram da pesquisa, meu mais profundo afeto e gratidão.

O presente trabalho foi realizado com apoio da **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES)** - Código de Financiamento 001.

O presente trabalho foi realizado com apoio da **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, processo nº 2017/18838-1.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, **meus sinceros agradecimentos!**

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

RESUMO

A doença periodontal de longa duração pode provocar alterações pulpareas. O objetivo deste presente estudo clínico foi investigar a microbiota e quantificar os níveis de endotoxinas (LPS) e ácido lipoteicóico (LTA) antes (C1) e após (C2) o preparo químico-mecânico (PQM) e após o uso de uma medicação intracanal (MIC) à base de hidróxido de cálcio por 30 dias (C3) nas bolsas periodontais (BP) e canais radiculares (CR) de dentes com polpa vital associados a doença periodontal, que não responderam à terapia periodontal. Dez dentes com doença periodontal e resposta positiva ao teste de sensibilidade pulpar que estavam sob tratamento periodontal por no mínimo 6 meses foram selecionados. Amostras das BP e CR foram coletadas com cones de papel estéreis/apirogênicos. A microbiota das BP e dos CR foi caracterizada através das técnicas moleculares – Nested PCR (17 primers) e *Checkerboard DNA-DNA hybridization* (CB) (40 sondas bacterianas). A quantificação de LPS e de LTA em ambos os sítios foram realizadas através do método de LAL pyrogent 5000 e ELISA, respectivamente. Foi detectado DNA bacteriano em todas as amostras das BP e CR (10/10). Pelo Nested PCR, das 17 bactérias investigadas, todas estavam presentes nas BP e 11 nos CR. Foi observada alta prevalência de *E. faecalis* e *F. nucleatum* nas BP e CR em todas as etapas do tratamento endodôntico. Pelo CB, 39 espécies foram detectadas em algum momento do tratamento endodôntico nas BP e 25 espécies nos CR. Nas BP, 12 bactérias apresentaram carga entre 10^5 e 10^6 células e *F. nucleatum* apresentou carga de aproximadamente 10^6 células. Nos CR, apenas 2 espécies apresentaram carga microbiana entre 10^5 e 10^6 . Das 14 bactérias comuns a ambos os métodos de identificação microbiana, O Nested PCR apresentou maior sensibilidade que o CB ($p < 0,05$). Níveis de LPS foram detectados nas BP e CR. Após o PQM houve redução de 31,59% nos níveis de LPS nas BP ($p < 0,05$) e após a MIC de 73,38% ($p < 0,05$). Nos CR, após o PQM, foi observada redução 80% ($p < 0,05$) e após a MIC de 90% ($p < 0,05$). Foi detectado LTA nas BP e CR. Após o PQM, houve redução de 34,49% ($p < 0,05$) e de 28,45% após a MIC ($p > 0,05$) nas BP. Nos CR, após o PQM houve redução de 11,55% ($p < 0,05$) e após a MIC de 47,93% ($p < 0,05$). Conclui-se que a microbiota das BP e CR de dentes com vitalidade pulpar e doença periodontal associada é polimicrobiana, com presença de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, anaeróbias facultativas e anaeróbias estritas. O PQM e a MIC promoveram redução do conteúdo infeccioso das BP e CR. Os métodos utilizados foram eficazes

para a caracterização da microbiota das BP e CR. O PQM e a MIC foram efetivos na redução dos níveis de LPS nas BP e CR. A MIC foi eficaz na redução significativa dos níveis de LTA nas BP e CR.

Palavras-Chave: Bactérias. Doença periodontal. Endodontia. Lipopolissacarídeos. Ácido lipoteicóico.

ABSTRACT

Long-term periodontal disease can cause pulpal changes. The aim of this clinical study is to investigate the microbiota and to quantify the levels of endotoxins (LPS) and lipoteichoic acid (LTA) in root canals (RC) and periodontal pockets (PP) of teeth submitted to endodontic therapy with chronic periodontal disease with secondary endodontic involvement that did not respond to the periodontal therapy, before and after the chemo-mechanical preparation (CMP) and after the use of an intracanal medication (ICM) for 30 days. Ten teeth with periodontal disease and positive response to the pulp sensitivity test that were under periodontal treatment for at least 6 months were selected. Samples from PP and RC were collected by using sterile/apirogenic paper points. The microbiota of PP and RC was characterized using molecular methods – Nested PCR and Checkerboard DNA-DNA hybridization. Quantification of LPS and LTA in both sites were performed using LAL Pyrogen 500 and ELISA, respectively. Bacterial DNA was detected in all PP and RC samples (10/10). By Nested PCR, of the 17 bacteria investigated, all were present in the PP and 11 in the RC. A high prevalence of *E. faecalis* and *F. nucleatum* was observed in PP and RC at all stages of endodontic treatment. By CB, 39 species were detected at some time of the endodontic treatment in the PP and 25 species in the RC. In PP, 12 bacteria had a load between 10^5 and 10^6 cells and *F. nucleatum* had a load of approximately 10^6 cells. In the RC, only 2 species showed microbial load between 10^5 and 10^6 . Of the 14 bacteria common to both microbial identification methods. Nested PCR presented higher sensitivity than CB ($p < 0.05$). Levels of LPS were detected in PP and RC. After CMP, there was a reduction of 31.59% in LPS levels in PP ($p < 0.05$) and after ICM in 73.38% ($p < 0.05$). In the RC, after CMP, a bacterial reduction of 80% ($p < 0.05$) and after ICM of 90% was observed ($p < 0.05$). LTA was detected in PP and RC. After CMP, there was a reduction of 34.49% ($p < 0.05$) and after ICM of 28.45% ICM ($p > 0.05$) in PP. In RC, after CMP, there was a reduction of 11.55% ($p < 0.05$) and after MIC of 47.93% ($p < 0.05$). It was concluded that the microbiota of PP and RC of teeth with vital pulp associated with periodontal disease is polymicrobial, with presence of Gram-negatives, Gram-positives, facultative and strict anaerobic bacteria. CMP and ICM promoted reduction of the infectious content of PP and RC. The methods used were effective for characterizing the microbiota of PP and RC. CMP and ICM were effective

in reducing LPS levels in PP and RC. ICM was effective in significantly reducing LTA levels in PP and RC.

Keywords: Bacteria. Periodontal disease. Endodontics. Lipopolysaccharides.
Lipoteichoic acid

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Reação de Nested PCR.....	76
Figura 2	Processamento de endotoxinas pelo ensaio LaL Pyrogen 5000.....	81
Figura 3	Ácido lipoteicóico (ELISA Kit).....	84
Figura 4	Prevalência das 17 bactérias encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares nas diferentes etapas do tratamento endodôntico de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário (n = 10).....	90
Figura 5	Prevalência e carga microbiana das espécies Gram-positivas detectadas nas bolsas periodontais (n = 10) por meio do <i>checkerboard DNA-DNA hybridization</i> de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário.....	95
Figura 6	Prevalência e carga microbiana das espécies Gram-negativas detectadas nas bolsas periodontais (n = 10) por meio do <i>checkerboard DNA-DNA hybridization</i> de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário.....	96
Figura 7	Prevalência e carga microbiana das espécies Gram-positivas detectadas nos canais radiculares (n = 10) por meio do <i>checkerboard DNA-DNA hybridization</i> de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário.....	97

Figura 8 Prevalência e carga microbiana das espécies Gram-negativas detectadas nos canais radiculares (n = 10) por meio do *checkerboard DNA-DNA hybridization* de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário.....98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Diluição da solução de endotoxina de <i>E. coli</i> para determinação da curva padrão.....	82
Tabela 2	Caracterização da amostra em relação aos aspectos clínicos dos pacientes com lesão periodontal primária com envolvimento endodôntico secundário (n = 10).....	87
Tabela 3	Prevalência de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas investigadas nos canais radiculares e bolsas periodontais nas diferentes etapas do tratamento endodôntico em dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário.....	91
Tabela 4	Comparação entre as técnicas moleculares do Nested PCR e <i>Checkerboard DNA-DNA hybridization</i> na detecção de bactérias (n = 14) encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares antes do preparo químico-mecânico, após o preparo químico-mecânico e após medicação intracanal nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário (n = 10).....	100
Tabela 5	Mediana (valor mínimo e máximo) dos níveis de endotoxina EU/mL antes do preparo químico-mecânico, após o preparo químico-mecânico e após medicação intracanal nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário (n = 10).....	103

Tabela 6 Mediana (valor mínimo e máximo) dos níveis de ácido lipoteicóico (Pg/mL) antes do preparo químico-mecânico, após o preparo químico-mecânico e após medicação intracanal nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário (n = 10).....106

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	31
2.	REVISÃO DA LITERATURA.....	33
	2.1. Inter-relação entre a polpa e o periodonto.....	33
	2.2. Vias de comunicações fisiológicas.....	34
	2.2.1. Túbulos dentinários.....	35
	2.2.2. Canais laterais, Secundários e Acessórios.....	37
	2.2.3. Forame apical.....	40
	2.2.4. Sulco palato-gengival.....	40
	2.3. Vias de comunicações não-fisiológicas.....	41
	2.4. Efeitos da doença periodontal sobre a polpa.....	42
	2.5. Classificação das lesões endoperiodontais.....	45
	2.5.1. Características clínicas que auxiliam na classificação das lesões endoperiodontais.....	49
	2.6. Aspectos microbiológicos das lesões endoperiodontais.....	50
	2.7. Métodos moleculares de identificação microbiana – Nested PCR e <i>Checkerboard DNA-DNA hybridization</i>	55
	2.8. Endotoxinas e exotoxinas em infecções endodônticas e periodontais.....	56
	2.9. Preparo químico-mecânico e uso de medicação intracanal na redução de micro-organismos.....	59
3.	PROPOSIÇÃO.....	63

4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	64
4.1.	Comitê de Ética em Pesquisa.....	64
4.2.	Seleção de pacientes.....	64
4.2.1.	Critérios de inclusão e exclusão, aspectos clínicos e radiográficos.....	64
4.3.	Procedimentos clínicos e coleta das amostras dos canais radiculares e bolsas periodontais.....	66
4.3.1.	Detalhamento das coletas periodontais.....	67
4.3.2.	Detalhamento das coletas dos canais radiculares.....	68
4.4.	Procedimentos laboratoriais.....	72
4.4.1.	Identificação microbiana pelo método molecular - Nested PCR.....	72
4.4.2.	Identificação microbiana pelo método molecular - <i>Checkerboard DNA-DNA Hybridization</i>	76
4.4.3.	Quantificação de endotoxinas (LPS).....	81
4.4.4.	Quantificação de ácido lipoteicoico (LTA).....	84
4.5.	Análise estatística.....	85
5.	RESULTADOS.....	86
5.1.	Aspectos clínicos.....	86
5.1.1.	Caracterização da amostra em relação aos aspectos clínicos dos pacientes com lesão periodontal primária com envolvimento endodôntico secundário.....	86
5.2.	Identificação microbiana através do método molecular - Nested PCR.....	87

5.2.1. Efeito do preparo químico-mecânico na microbiota das bolsas periodontais através do método molecular Nested PCR.....	87
5.2.2. Efeito da medicação intracanal à base de hidróxido de cálcio na microbiota das bolsas periodontais através do método molecular Nested PCR.....	88
5.2.3. Efeito do preparo químico-mecânico na microbiota dos canais radiculares através do método molecular Nested PCR.....	89
5.2.4. Efeito da medicação intracanal à base de hidróxido de cálcio na microbiota dos canais radiculares através do método molecular Nested PCR.....	89
5.3. Identificação microbiana através método molecular - <i>Checkerboard DNA-DNA Hybridization</i>	92
5.3.1. Efeito do preparo químico-mecânico na microbiota das bolsas periodontais através do método molecular <i>Checkerboard DNA-DNA Hybridization</i>	92
5.3.2. Efeito da medicação intracanal à base de hidróxido de cálcio na microbiota das bolsas periodontais através do método molecular <i>Checkerboard DNA-DNA Hybridization</i>	93
5.3.3. Efeito do preparo químico-mecânico na microbiota dos canais radiculares através do método molecular <i>Checkerboard DNA-DNA Hybridization</i>	93
5.3.4. Efeito do preparo químico-mecânico na microbiota dos canais radiculares através do método molecular <i>Checkerboard DNA-DNA Hybridization</i>	94
5.4. Comparação entre os achados dos métodos moleculares – Nested PCR e <i>Checkerboard DNA-DNA Hybridization</i>	99
5.5. Quantificação de endotoxinas (LPS).....	101

5.5.1. Efeito do preparo químico-mecânico nos níveis de endotoxinas nas bolsas periodontais.....	101
5.5.2. Efeito da medicação intracanal à base de hidróxido de cálcio nos níveis de endotoxinas nas bolsas periodontais.....	101
5.5.3. Efeito do preparo químico-mecânico nos níveis de endotoxinas nos canais radiculares.....	102
5.5.4. Efeito da medicação intracanal à base de hidróxido de cálcio nos níveis de endotoxinas nos canais radiculares.....	102
5.5.5. Comparação dos níveis de endotoxinas nas bolsas periodontais e nos canais radiculares nas diferentes etapas do tratamento endodôntico.....	102
5.6. Quantificação de ácido lipoteicóico (LTA).....	104
5.6.1. Efeito do preparo químico-mecânico nos níveis de ácido lipoteicóico nas bolsas periodontais.....	104
5.6.2. Efeito da medicação intracanal nos níveis de ácido lipoteicóico nas bolsas periodontais.....	104
5.6.3. Efeito do preparo químico-mecânico nos níveis de ácido lipoteicóico nos canais radiculares.....	104
5.6.4. Efeito da medicação intracanal nos níveis de ácido lipoteicóico nos canais radiculares.....	105
5.6.5. Comparação dos níveis de ácido lipoteicóico nas bolsas periodontais e nos canais radiculares nas diferentes etapas do tratamento endodôntico.....	105
6. DISCUSSÃO.....	107
7. CONCLUSÃO.....	115
REFERÊNCIAS.....	116
APÊNDICES.....	138

Apêndice 1 - Ficha clínica para coleta de informações dos pacientes envolvidos na pesquisa.....	138
Apêndice 2 - Dados clínicos dos 10 dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário.....	141
Apêndice 3 - Prevalência de <i>Treponema denticola</i> encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo Nested PCR.....	143
Apêndice 4 - Prevalência de <i>Treponema socransky</i> encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo Nested PCR.....	144
Apêndice 5 - Prevalência de <i>Gemella morbillorum</i> encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo Nested PCR.....	145
Apêndice 6 - Prevalência de <i>Tannerella forsythia</i> encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo Nested PCR.....	146
Apêndice 7 - Prevalência de <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo Nested PCR.....	147
Apêndice 8 - Prevalência de <i>Porphyromonas endodontalis</i> encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo Nested PCR.....	148
Apêndice 9 - Prevalência de <i>Porphyromonas gingivalis</i> encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo Nested PCR.....	149
Apêndice 10 - Prevalência de <i>Prevotella intermedia</i> encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo Nested PCR.....	150

Apêndice 11 - Prevalência de <i>Prevotella tannerae</i> encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo Nested PCR.....	151
Apêndice 12 - Prevalência de <i>Prevotella nigrescens</i> encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo Nested PCR.....	152
Apêndice 13 - Prevalência de <i>Filifactor alocis</i> encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo Nested PCR.....	153
Apêndice 14 - Prevalência de <i>Fusobacterium nucleatum</i> encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo Nested PCR.....	154
Apêndice 15 - Prevalência de <i>Parvimonas micra</i> encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo Nested PCR.....	155
Apêndice 16 - Prevalência de <i>Actinomyces naeslundii</i> encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo Nested PCR.....	156
Apêndice 17 - Prevalência de <i>Dialister pneumosintes</i> encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo Nested PCR.....	157
Apêndice 18 - Prevalência de <i>Enterococcus faecalis</i> encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo Nested PCR.....	158
Apêndice 19 - Prevalência de <i>Streptococcus sobrinus</i> encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo Nested PCR.....	159

Apêndice 20 - Detecção de <i>Enterococcus hirae</i> encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo <i>Checkerboard DNA-DNA hybridization</i>	160
Apêndice 21 - Detecção de <i>Enterococcus faecium</i> encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo <i>Checkerboard DNA-DNA hybridization</i>	161
Apêndice 22 - Detecção de <i>Eubacterium nodatum</i> encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo <i>Checkerboard DNA-DNA hybridization</i>	162
Apêndice 23 - Detecção de <i>Porphyromonas gingivalis</i> encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo <i>Checkerboard DNA-DNA hybridization</i>	163
Apêndice 24 - Detecção de <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo <i>Checkerboard DNA-DNA hybridization</i>	164
Apêndice 25 - Detecção de <i>Fusobacterium nucleatum</i> (sp. <i>vincentii</i>) encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo <i>Checkerboard DNA-DNA hybridization</i>	165
Apêndice 26 - Detecção de <i>Campylobacter rectus</i> encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo <i>Checkerboard DNA-DNA hybridization</i>	166

Apêndice 27 - Detecção de <i>Treponema socransky</i> encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo <i>Checkerboard DNA-DNA hybridization</i>	167
Apêndice 28 - Detecção de <i>Eubacterium saburreum</i> encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo <i>Checkerboard DNA-DNA hybridization</i>	168
Apêndice 29 - Detecção de <i>Parvimonas micra</i> encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo <i>Checkerboard DNA-DNA hybridization</i>	169
Apêndice 30 - Detecção de <i>Veillonella parvula</i> encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo <i>Checkerboard DNA-DNA hybridization</i>	170
Apêndice 31 - Detecção de <i>Actinomyces oris</i> encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo <i>Checkerboard DNA-DNA hybridization</i>	171
Apêndice 32 - Detecção de <i>Enterococcus faecalis</i> encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo <i>Checkerboard DNA-DNA hybridization</i>	172
Apêndice 33 - Detecção de <i>Dialister pneumosintes</i> encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo <i>Checkerboard DNA-DNA hybridization</i>	173
Apêndice 34 - Detecção de <i>Porphyromonas endodontalis</i> encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo <i>Checkerboard DNA-DNA hybridization</i>	174

Apêndice 35 - Detecção de <i>Streptococcus oralis</i> encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo <i>Checkerboard DNA-DNA hybridization</i>	175
Apêndice 36 - Detecção de <i>Capnocytophaga ochracea</i> encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo <i>Checkerboard DNA-DNA hybridization</i>	176
Apêndice 37 - Detecção de <i>Actinomyces israelii</i> encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo <i>Checkerboard DNA-DNA hybridization</i>	177
Apêndice 38 - Detecção de <i>Streptococcus intermedius</i> encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo <i>Checkerboard DNA-DNA hybridization</i>	178
Apêndice 39 - Detecção de <i>Treponema denticola</i> encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo <i>Checkerboard DNA-DNA hybridization</i>	179
Apêndice 40 - Detecção de <i>Prevotella nigrescens</i> encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo <i>Checkerboard DNA-DNA hybridization</i>	180
Apêndice 41 - Detecção de <i>Actinomyces odontolyticus</i> encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo <i>Checkerboard DNA-DNA hybridization</i>	181
Apêndice 42 - Detecção de <i>Fusobacterium nucleatum</i> (sp. <i>polymorphum</i>) encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo <i>Checkerboard DNA-DNA hybridization</i>	182

Apêndice 43 - Detecção de <i>Campylobacter Showae</i> encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo <i>Checkerboard DNA-DNA hybridization</i>	183
Apêndice 44 - Detecção de <i>Fusobacterium periodonticum</i> encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo <i>Checkerboard DNA-DNA hybridization</i>	184
Apêndice 45 - Detecção de <i>Neisseria mucosa</i> encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo <i>Checkerboard DNA-DNA hybridization</i>	185
Apêndice 46 - Detecção de <i>Fusobacterium nucleatum</i> encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo <i>Checkerboard DNA-DNA hybridization</i>	186
Apêndice 47 - Detecção de <i>Capnocytophaga gingivalis</i> encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo <i>Checkerboard DNA-DNA hybridization</i>	187
Apêndice 48 - Detecção de <i>Streptococcus gordonii</i> encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo <i>Checkerboard DNA-DNA hybridization</i>	188
Apêndice 49 - Detecção de <i>Tannerella forsythia</i> encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo <i>Checkerboard DNA-DNA hybridization</i>	189
Apêndice 50 - Detecção de <i>Staphylococcus epidermidis</i> encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo <i>Checkerboard DNA-DNA hybridization</i>	190

Apêndice 51 - Detecção de <i>Propionibacterium acnes</i> encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo <i>Checkerboard DNA-DNA hybridization</i>	191
Apêndice 52 - Detecção de <i>Prevotella melaninogenica</i> encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo <i>Checkerboard DNA-DNA hybridization</i>	192
Apêndice 53 - Detecção de <i>Streptococcus mitis</i> encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo <i>Checkerboard DNA-DNA hybridization</i>	193
Apêndice 54 - Detecção de <i>Eikenella corrodens</i> encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo <i>Checkerboard DNA-DNA hybridization</i>	194
Apêndice 55 - Detecção de <i>Gemella morbillorum</i> encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo <i>Checkerboard DNA-DNA hybridization</i>	195
Apêndice 56 - Detecção de <i>Capnocytophaga sputigena</i> encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo <i>Checkerboard DNA-DNA hybridization</i>	196
Apêndice 57 - Detecção de <i>Filifactor alocis</i> encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo <i>Checkerboard DNA-DNA hybridization</i>	197
Apêndice 58 - Detecção de <i>Streptococcus mutans</i> encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo <i>Checkerboard DNA-DNA hybridization</i>	198

Apêndice 59 - Detecção de <i>Prevotella intermedia</i> encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo <i>Checkerboard DNA-DNA hybridization</i>	199
Apêndice 60 - Níveis de endotoxinas detectados nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo método LAL pyrogen 5000.....	200
Apêndice 61 - Níveis de ácido lipoteicóico detectados nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário por meio de ensaio de imunoabsorção enzimática – ELISA.....	201
ANEXOS.....	202
Anexo 1 - Certificado de aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP.....	202
Anexo 2 - Termo de consentimento livre e esclarecido específico para a pesquisa.....	203
Anexo 3 - Relatório de verificação de originalidade e prevenção de plágio.....	207

INTRODUÇÃO

A doença periodontal é considerada a principal causa de perda dentária em adultos, afetando 47% da população norte-americana e brasileira, tendo sido associada com doenças sistêmicas, como doenças cardiovasculares, diabetes mellitus tipo 2, resultados adversos da gravidez e osteoporose (Grossi & Genco, 1998; Pradhan & Goel, 2011; Abariga & Whitcomb, 2016). A doença periodontal de longa duração pode provocar alterações pulpareas (Kwon et al., 2013). Por essa razão a terapia endodôntica tem sido sugerida em casos nos quais a doença periodontal não responde à terapia (Simring & Goldberg, 1964; Berber, 2009; Duque, 2013; Gomes et al., 2015; Duque, 2016; Chapola, 2017; Duque et al., 2018). Além disso, o tratamento endodôntico pode favorecer o reparo dos tecidos periodontais doente (Blonlöf et al., 1988; Stashenko et al., 1991; Li et al., 2014).

As lesões endoperiodontais, também conhecidas como lesões endoperio, são caracterizadas por alterações patológicas com envolvimento pulpar e periodontal em um mesmo dente (Solomon et al., 1995; Al-Fouzan, 2014; Gomes et al., 2015). São lesões resultantes de produtos inflamatórios encontrados nos tecidos periodontal e pulpar. Diante da presença de necrose pulpar é de senso comum que o tratamento endodôntico deve ser realizado com o objetivo de promover reparo periodontal mesmo nos casos em que a terapia periodontal já tenha sido iniciada (Kwon et al., 2013). Por outro lado, com o envolvimento endodôntico secundário, na presença de vitalidade pulpar, o tratamento endodôntico tem sido sugerido e indicado em casos em que a doença periodontal não responde à terapia (Simring & Goldberg, 1964). Nestes casos, a realização de um tratamento endodôntico de alta qualidade, em termos de instrumentação e irrigação é essencial para obtenção de altas taxas de sucesso do tratamento em geral (Vianna et al., 2007; Gomes et al., 2009b; Gomes et al., 2012; Marinho et al., 2015; Barbosa-Ribeiro et al., 2016). Atualmente, acredita-se que a utilização de uma medicação intracanal possa servir como um reservatório com capacidade de atuação nas bolsas periodontais, alterando assim o perfil microbiológico e endotóxico nestes sítios (Duque, 2013; Gomes et al., 2015; Duque, 2016; Chapola, 2017; Duque et al., 2018). Apesar de existir uma extensa literatura quanto à microbiota associada a lesões periodontais, e as lesões endodônticas separadamente, até o presente momento poucos estudos se dedicaram a

investigação da microbiota de lesões combinadas, ou seja, de lesões endoperiodontais (LEP), particularmente de dentes com doença periodontal crônica e envolvimento endodôntico secundário, com vitalidade pulpar. Desta maneira, é de grande importância a realização de um estudo clínico do perfil microbiológico, de LPS e LTA nas diferentes etapas do tratamento endodôntico em dentes com vitalidade pulpar associados à doença periodontal, com o objetivo de monitorar o efeito do tratamento endodôntico sobre as bactérias e seus produtos de virulência, tanto na bolsa periodontal como no canal radicular.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Inter-relação entre a polpa e o periodonto

A polpa dentária e o periodonto são duas estruturas anatomicamente distintas, porém funcionalmente inter-relacionadas, visto que ambas apresentam a mesma origem embrionária e formação concomitante (Chilton & Fertig 1972; Gomes et al., 2009; Chapola, 2017; Duque et al., 2018).

O desenvolvimento dos tecidos pulpare e periodontais inicia-se no começo da fase embrionária, quando as células da crista neural (ou do tubo neural do embrião) migram para o primeiro arco branquial (Katchburian & Arana, 2012; Chapola, 2017). Após a formação da lâmina dental, inicia-se uma série de processos, tais como estágio de botão, estágio de capuz, estágio de campânula e o desenvolvimento da raiz, que resultam na formação do elemento dental e seus tecidos periodontais, incluindo osso alveolar (Katchburian & Arana, 2012). Durante o estágio de capuz, células ectomesenquimais condensam-se em relação ao epitélio oral, dando origem a papila dentária, que futuramente formará a dentina e a polpa, e o folículo dentário, que originará os tecidos periodontais de suporte (Katchburian & Arana, 2012; Duque et al., 2018). A papila dentária é circundada pela bainha epitelial de Hertwig que cresce em direção basal entre o folículo dentário e a papila dentária, mantendo uma abertura em sua base, conhecida como forame apical primário (Katchburian & Arana, 2012). A confluência contínua desses tecidos na região apical permanece após o completo desenvolvimento dental. Sendo assim, é natural que, estruturalmente, o tecido pulpar próximo ao ápice se assemelhe mais ao tecido do ligamento periodontal naquela área, do que propriamente ao tecido conjuntivo pulpar (Stallard, 1972; Osborn & Ten Cate, 1988). No processo de formação da região radicular, a projeção apical da bainha epitelial de Hertwig pode ser interrompida por vasos sanguíneos ou nervos passando através dos tecidos mesodérmicos. A indução do desenvolvimento odontoblástico e subsequente deposição dentinária e cementária nas regiões com ausência do tecido indutor, a bainha epitelial radicular, ocorre a penetração de vasos sanguíneos ou nervos. Portanto, um vaso sanguíneo, nervo, ou outro tecido passando através da bainha radicular resulta no desenvolvimento de um canal através do cimento e da dentina, promovendo uma comunicação direta entre o ligamento periodontal e polpa.

O suprimento sanguíneo do aparato de inserção periodontal ganha acesso ao tecido pulpar através de algumas comunicações: canais acessórios, canais laterais, canais da furca, e uma variedade de foraminas apicais (Chacker, 1974; Ten Cate, 1994; Walton & Torabinejad, 1997; Aguiar, 1999, Berber, 2009; Duque, 2013; Gomes et al., 2015; Duque, 2016; Rotstein et al., 2017; Chapola, 2017; Duque et al., 2018). Seltzer et al. (1963) também destacaram que à medida que o germe dentário se desenvolve, estabelecem-se vias anatômicas que comunicam o endodonto e o periodonto, tais como o forame apical (principal delas), os canais laterais e acessórios e áreas permeáveis da dentina e do cimento radicular.

Na presença de alterações inflamatórias no tecido pulpar ou periodontal, um pode afetar o outro, pois essas possíveis vias de comunicação fazem com que o trânsito de micro-organismos e seus subprodutos seja facilitado, podendo funcionar como caminhos para a reciprocidade inflamatória e infecciosa entre essas duas estruturas (Kobayashi et al., 1990; Chen et al., 1997; Leonardo & Leal, 1998; Berber, 2009; Duque, 2013; Li et al., 2014; Gomes et al., 2015; Duque, 2016; Chapola, 2017; Duque et al., 2018).

2.2. Vias de comunicações fisiológicas

As principais vias de comunicação entre a polpa e o periodonto são os túbulos dentinários, canais laterais, secundários e acessórios e o forame apical (Chilton & Fertig 1972; Christie & Holthuis, 1990; Jansson et al., 1993; Chen et al., 1997; Rotstein & Simon, 2004; Gomes et al., 2006a; Gomes et al., 2009, Duque, 2013; Gomes et al., 2015; Duque, 2016; Duque et al., 2018). A literatura aponta que a doença pulpar pode iniciar e/ou manter uma doença periodontal através dessas vias de comunicação (Chilton & Fertig 1972; Christie & Holthuis, 1990; Jansson et al., 1993; Chen et al., 1997; Rotstein & Simon, 2004; Gomes et al., 2006a; Gomes et al., 2009; Berber, 2009; Duque 2013; Gomes et al., 2015; Duque, 2016; Chapola, 2017; Duque et al., 2018). No entanto, a situação contrária ainda gera questionamentos, pois pouco se sabe sobre o real efeito da progressão da doença periodontal na polpa (Mazur & Massler, 1964; Bender & Seltzer, 1972; Langeland et al., 1974; Bergenholtz & Lindhe, 1978; Solomon et al., 1995; Walton & Torabinejad, 1997; Paul & Hutter, 1997; Bergenholtz & Hasselgren, 1999; Petka, 2000; Wang & Glickman, 2002; Rotstein &

Simon, 2006; Cardon et al., 2007; Berber, 2009; Duque, 2013, 2016; Chapola, 2017).

2.2.1. Túbulos dentinários

Os túbulos dentinários têm sido sugeridos como um caminho comum entre o periodonto e o tecido pulpar, pois os mesmos contêm extensões citoplasmáticas ou processos odontoblásticos que se estendem dos odontoblastos na interface polpa-dentina à junção dentina-esmalte ou junção cimento-dentinária (Gutmann, 1978; Whyman, 1988; Cohen & Hargreaves, 2017). Tem sido relatado que a câmara pulpar pode se comunicar com a superfície externa radicular através dos túbulos dentinários, especialmente quando o cimento está exposto (Gutmann, 1978; Whyman, 1988; Cohen & Hargreaves, 2017).

Túbulos dentinários expostos em áreas desprovidas de cimento podem servir como vias de comunicação entre a polpa dental e o ligamento periodontal (Lopes & Siqueira, 2015). A exposição dos túbulos dentinários pode ocorrer em virtude de defeitos do desenvolvimento, doença ou procedimentos periodontais ou cirúrgicos, como por exemplo procedimento de raspagem e alisamento radicular (Cohen & Hargreaves, 2017), favorecendo a invasão de substâncias nocivas externas, como por exemplo, bactérias e seus subprodutos, podendo causar efeitos sobre o tecido pulpar (Berber, 2009; Duque, 2013; Gomes et al., 2015; Duque, 2016; Chapola, 2017; Duque et al., 2018). Isso ocorre devido à sua estrutura tubular, através da qual irritantes podem se difundir e afetar estruturas pulpares e periodontais.

Alyahya et al. (2017) realizaram um estudo que avaliou o efeito da ausência de cimento na penetração bacteriana. Foram avaliados 107 dentes unirradiculares com ápices fechados divididos em 2 grupos, cimento presente e cimento removido. Cada grupo foi dividido aleatoriamente em 2 subgrupos, sendo eles com 2 e 4 semanas de infecção. Os resultados suportam a hipótese de que a ausência de cimento facilita a penetração bacteriana nos túbulos dentinários e também sugerem que o processo de infecção da dentina radicular é tempo-dependente evidenciando a necessidade e importância da realização do tratamento precoce dos dentes infectados, especialmente em situações em que se suspeita de descontinuidade do cimento.

Bozbay et al. (2018) investigaram os efeitos de três métodos distintos de tratamento periodontal em comparação com a instrumentação manual no cimento residual de dentes com doença periodontal, sendo que o método ideal para a terapia periodontal deve envolver a remoção de biofilme, cálculo e endotoxina, preservando o cimento radicular. Avaliando 48 dentes unirradiculares de pacientes diagnosticados com periodontite crônica severa, os dentes foram instrumentados subgingivalmente por curetas manuais, insertos ultrassônicos piezoelétricos, insertos ultrassônicos piezoelétricos após polimento com ar ou apenas polimento com ar. Após a extração dos dentes, os locais instrumentados e não instrumentados foram analisados com um microscópio de dissecação e através da microscopia eletrônica de varredura para medir a quantidade e observar as características superficiais do cimento residual. Concluíram que, o polimento com ar foi melhor que ultrassom na preservação do cimento, enquanto que as curetas foi o método que mais removeu cimento.

É importante ressaltar que a permeabilidade da dentina radicular não é uniforme. As regiões cervical e média apresentam permeabilidades superiores à dentina apical, visto que os túbulos são mais calibrosos e numerosos (Berber, 2009, Duque, 2013, 2016; Chapola, 2017). Segundo Nakabayashi & Pashley (1998) a permeabilidade dentinária é a facilidade em que uma substância tem em se difundir através de uma barreira, ou seja, um substrato. Os autores ainda relatam que a permeabilidade dentinária pode ser tanto intra-tubular quanto inter-tubular.

O diâmetro dos túbulos diminui com a idade ou em resposta a um estímulo crônico de baixa intensidade que causa aposição de dentina peritubular altamente mineralizada (Mjor & Nordahl, 1996; Komabayashi et al., 2008). O número de túbulos dentinários varia de aproximadamente 8.000 na JCD a 57.000 por milímetro quadrado na porção terminal da polpa (Mjor & Nordahl, 1996; Komabayashi et al., 2008). Na área cervical da raiz, existem cerca de 15.000 túbulos dentinários/mm² (Mjor & Nordahl, 1996; Komabayashi et al., 2008).

Quando o cimento e o esmalte não se encontram na junção cimento-esmalte (JCE), esses túbulos ficam expostos, criando, assim, vias de comunicação entre a polpa e o ligamento periodontal (Lopes & Siqueira 2015). São exemplo desse fenômeno, pacientes que apresentam hipersensibilidade dentinária cervical (Lopes &

Siqueira 2015). Fluidos contaminados e agentes irritantes podem escoar por meio dos túbulos dentinários patentes e, na ausência de um esmalte intacto ou de um revestimento cementário, a polpa pode ser considerada exposta ao meio oral através do sulco gengival ou bolsa periodontal (Lopes & Siqueira 2015). Estudos experimentais demonstram que o material solúvel da placa bacteriana aplicado sobre a dentina exposta pode causar inflamação pulpar, indicando que os túbulos dentinários podem proporcionar acesso imediato entre o periodonto e a polpa (Bergenholtz & Lindhe, 1978). Muller & Van (1984) e Schroeder & Scherle (1988) investigaram por microscopia eletrônica de varredura que a exposição dentinária na JCE ocorreu em cerca de 18% dos dentes em geral e em 25% dos dentes anteriores em particular, sendo que o mesmo dente pode apresentar diferentes características na JCE mostrando exposição dentinária em uma superfície enquanto as outras superfícies estão recobertas por cimento. Essa área se torna importante na avaliação da progressão dos patógenos endodônticos, bem como no resultado da raspagem radicular e no planejamento da integridade cementária, trauma e alteração patológica induzida por clareamento (Rotstein et al., 1991a; Rotstein et al., 1991b; Ehnevid et al., 1995, Berber, 2009; Duque, 2013, 2016).

2.2.2. Canais laterais, secundários e acessórios

Os canais laterais e acessórios, principalmente na área apical e na furca dos molares, também conectam a polpa dentária com o ligamento periodontal e caracteristicamente contêm tecido conjuntivo e vasos que conectam o sistema circulatório da polpa com o do periodonto (Berber, 2009; Duque, 2013, 2016; Chapola, 2017).

Rubach et al. (1965) avaliaram 74 dentes e este estudo revelou que 45% dos canais acessórios estão presentes principalmente na região apical. Entre eles, a conexão dos canais acessórios com as bolsas periodontais foi microscopicamente demonstrada em cinco dos espécimes. Concluíram que a doença periodontal pode contribuir para mudanças indesejáveis do tecido pulpar.

Kirkham (1975) estudando 100 dentes humanos com doença periodontal extensa, investigou a localização e a frequência de canais acessórios e encontrou

canais laterais em 23% dos dentes examinados. Destes, em apenas 2% observou-se ramificações associadas à bolsa periodontal presente.

De Deus (1992) relatou, através da técnica de diafanização, utilizando 1140 dentes humanos adultos extraídos, que 17% dos dentes apresentavam múltiplos sistemas de canais no terço apical da raiz, cerca de 9% no terço médio e menos de 2% no terço coronário. Na região de bi e trifurcação dos molares e pré-molares estudados, 2,3% apresentavam-se com canais laterais que emanavam do canal principal. O autor ainda cita como comunicações diretas entre a cavidade pulpar e o ligamento periodontal as ramificações da cavidade pulpar (forame apical, foraminas, deltas apicais e os canais acessório, secundário, lateral e cavo inter-radicular), os túbulos dentinários em situações especiais e, eventualmente, as reabsorções de origem endodôntica, as perfurações dos canais radiculares, as fraturas radiculares totais ou parciais e os defeitos anatômicos (fissuras) das coroas de alguns dentes.

Ruccuci & Siqueira (2010), analisaram o estado histopatológico e histobacteriológico dos tecidos presentes em canais laterais e ramificações apicais, em diversas condições clínicas, bem como em resposta ao tratamento endodôntico. Os resultados mostraram que em relação aos dentes tratados, observaram que o tecido no interior das ramificações permanece relativamente pouco afetado por instrumentos e irrigantes após o preparo químico-mecânico, independentemente das condições pulpares iniciais. Materiais obturadores que foram forçados em canais laterais, em casos de polpa vital, apresentaram danos aos tecidos e inflamação. Mesmo que, radiograficamente o material obturador apareça nos canais laterais e ramificações apicais, isso não indica que a ramificação foi selada ou desinfetada. Concluíram que como bactérias localizadas em grandes ramificações podem causar ou manter uma doença, outras estratégias devem ser avaliadas com o objetivo de desinfetar essas regiões e melhorar o prognóstico do tratamento. Assim, canais laterais e ramificações apicais compreendem possíveis caminhos, através dos quais micro-organismos e/ou seus produtos podem transitar do canal radicular para bolsas periodontais e vice-versa. Eles são, indiscutivelmente, de difícil acesso, limpeza e desinfecção durante o tratamento endodôntico.

Sob condições clínicas rotineiras, são poucos os casos em que é possível

a identificação de canais laterais, secundários e acessórios, com base na interpretação de radiografias (Chapola, 2017). Entretanto, alguns cuidados clínicos podem ser úteis para sua identificação, como: presença de uma imagem radiográfica de uma lesão periapical lateral associada à uma polpa necrótica, identificação radiográfica de uma imagem na superfície lateral radicular, sugerindo a presença de um orifício e imagem de extravasamento de material obturador para o interior das ramificações (Walton & Torabinejad, 1997; Chapola, 2017).

O canal cavo inter-radicular é encontrado no assoalho da câmara pulpar, saindo desta e percorrendo a dentina interradicular, até alcançar o ligamento periodontal, em nível de furca, podendo servir como uma avenida de contaminação entre polpa e periodonto (Cesconetto et al., 2016; Chapola, 2017). Dessa forma, a existência do canal-cavo inter-radicular justificaria manifestações clínico-patológicas, como rarefações ósseas, envolvendo estruturas periodontais na região de furca de dentes multirradiculares (Seltzer et al., 1967).

Cesconetto et al. (2016) avaliaram a presença do canal cavo inter-radicular em cinco primeiros molares superiores, dez segundos molares superiores, dez primeiros molares inferiores e dez segundos molares inferiores, utilizando-se a microscopia eletrônica de varredura. Foi observada a presença de forames em 30% dos assoalhos e 50% das furcas dos primeiros molares inferiores, e 40% e 60% no assoalho e na furca dos segundos molares inferiores, respectivamente. A anatomia da cavidade pulpar dos molares é muito complexa, portanto é de fundamental importância, para o profissional de Odontologia, ter ciência de todas as suas variações, pois esses canais podem servir como vias de acesso de micro-organismos e/ou suas toxinas. A presença dessa comunicação com o periodonto parece não influenciar na saúde periodontal quando a polpa está vital; contudo, quando necrosada, pode desencadear, nos moldes do que ocorre na região apical, uma reação inflamatória, originando uma lesão periodontal ou, por outro lado, as intervenções periodontais podem também provocar aumento do número de canais expostos na região, tornando-os uma via de contaminação da polpa com um elevado grau de importância.

2.2.3. Forame apical

O forame apical é a principal via de comunicação entre a polpa e o periodonto. Produtos microbianos e inflamatórios podem infiltrar-se em direção ao forame apical, resultando em uma lesão perirradicular (Berber, 2009; Gomes et al., 2015; Chapola, 2017). A inflamação ou a necrose pulpar se estendem para os tecidos perirradiculares causando uma resposta inflamatória local geralmente associada à reabsorção óssea e radicular (Berber, 2009; Chapola, 2017).

O forame apical também é uma potencial porta de entrada de produtos inflamatórios de bolsas periodontais profundas para a polpa. Gadê-Neto (2000) concluiu que a polpa mantém boa capacidade de defesa contra os elementos agressores da doença periodontal, desde que o suprimento sanguíneo apical se mantenha intacto. Uma vez que se tenha uma doença periodontal instalada, as bactérias e seus subprodutos presentes em bolsas profundas também podem atingir o forame apical causando rompimento do feixe vasculho-nervoso e necrose pulpar. O tratamento endodôntico visa eliminar os fatores etiológicos intrarradiculares levando, assim, ao reparo dos tecidos perirradiculares afetados (Lopes & Siqueira, 2015).

2.2.4. Sulco palato-gengival

É uma anomalia de desenvolvimento encontrada nos incisivos superiores, dos quais os incisivos laterais são mais frequentemente afetados que os centrais (4,4% *versus* 0,28%, respectivamente) (Cohen & Hargreaves, 2017). Sua etiologia é decorrente da invaginação do órgão do esmalte e da bainha epitelial de Hertwig (Cohen & Hargreaves, 2017). Esse sulco normalmente começa na fossa central, atravessa o cíngulo e se estende apicalmente com distâncias variáveis (Rotstein & Simon, 2004).

Neves et al. (2015) verificaram que dos 1.668 incisivos analisados, 27 (1,61%) tinha o sulco palato-gengival, que pode ser localizado no centro da superfície da raiz palatina ou ligeiramente deslocado para uma das superfícies proximais da raiz. Assim, 1.641 (98,39%) dentes apresentaram completa ausência de sulco palato-gengival. Na presença do mesmo a inserção epitelial pode ser rompida, favorecendo o acúmulo de biofilme, formando uma bolsa periodontal ao longo de toda sua

extensão, podendo levar a uma complicação periodontal intratável e provocar danos ao tecido pulpar.

2.3. Vias de comunicações não-fisiológicas

É importante destacar que existem outras condições de inter-relação entre polpa e periodonto, denominadas “não fisiológicas”. Perfurações radiculares criam uma comunicação entre o sistema de canais e o ligamento periodontal (Fonseca et al., 2018). Isso pode ocorrer como resultado de iatrogenias, reabsorções externas e/ou internas ou cáries invadindo o assoalho de câmaras pulpares (Fonseca et al., 2018). Quanto mais próxima a perfuração está do sulco gengival ou bolsa periodontal, particularmente no terço cervical da raiz ou região de furca, maior é a probabilidade de um problema periodontal (Meng, 1999).

As fraturas verticais ocorrem ocasionalmente e podem ser vistas radiograficamente como um efeito de halo em volta do dente afetado (Rotstein & Simon, 2004, Meng, 1999). O local da fratura proporciona uma porta de entrada para bactérias e suas toxinas, fungos e vírus, além de corpos estranhos, colesterol, corpúsculo de Russel, corpúsculos hialinos de Rushton e cristais de Charcot-Leyden do sistema de canais radiculares para o ligamento periodontal que o circunda (Rotstein & Simon, 2004, Meng, 1999).

Andreasen et al. (2002) afirmaram que as fraturas e rachaduras verticais da raiz podem servir como potentes vias de contaminação do periodonto para o espaço pulpar, pois se o tecido periodontal tiver uma inflamação prévia, esse processo inflamatório poderá de disseminar até a polpa e resultar em necrose.

As reabsorções podem ocorrer tanto no espaço pulpar quanto no periodonto e se localizar tanto no interior do espaço do canal radicular (reabsorção interna) quanto na superfície externa da raiz (reabsorção externa) (Delzangles, 1988). Na polpa, este processo está associado a uma resposta inflamatória que progride até que a polpa se torne necrosada. Geralmente, também acompanhado por uma inflamação perirradicular. Praticamente, quase todos os dentes com lesão perirradicular exibirão certo grau de reabsorção radicular (Delzangles, 1988; Duque, 2013, 2016).

Quando confinada apenas ao espaço dos canais radiculares, as implicações sobre o ligamento periodontal são mínimas. Entretanto, uma vez que o defeito de reabsorção perfure as paredes da dentina, complicações periodontais aparecerão (Lopes & Siqueira, 2015).

2.4. Efeitos da doença periodontal sobre a polpa

Evidências mostram que a doença periodontal crônica é potencial causadora das alterações patológicas na polpa (Langeland et al., 1974), entretanto, para que ocorra o comprometimento pulpar, é necessário que a contaminação microbiana alcance a região do forame apical (Rotstein & Simon, 2006). Rubach et al. (1965) demonstraram que a pulpíte e a necrose pulpar podem ocorrer como resultado de uma inflamação periodontal envolvendo os canais apicais e acessórios. Além disso, os produtos e as toxinas bacterianas também podem ter acesso à polpa através dos túbulos dentinários expostos (Duque, 2013, 2016; Chapola, 2017; Duque et al., 2018).

Lindhe, em 1999, também afirmou que os infiltrados bacterianos periodontais podem atingir a polpa, quando há exposição de canais acessórios, inclusive os situados na região de furca em dentes molares. Adriaens et al. (1988), demonstraram que as bactérias, provenientes das bolsas periodontais, têm a capacidade de atingir os canais radiculares em direção à polpa, sugerindo que os túbulos dentinários representem potentes reservatórios para esses micro-organismos. Devido a esse fato, é possível que ocorra, até mesmo, uma recolonização da superfície radicular tratada.

O biofilme polimicrobiano é o principal fator etiológico das periodontites crônicas, formados por complexas comunidades microbianas (Chapola, 2017). Acredita-se que a doença seja iniciada após mudanças na microbiota que compõe esse biofilme subgengival (Chapola, 2017). A adesão entre as espécies de micro-organismos que compõe esse biofilme envolve moléculas associadas à superfície bacteriana, e as interações entre as espécies bacterianas são essenciais no desenvolvimento espacial de um biofilme polimicrobiano (Chapola, 2017). Além disso, essas interações intensificam a progressão da doença periodontal (Ng et al., 2016). Complexos microbianos que colonizam a área subgengival, como biofilme, podem

promover uma variedade de interrelações com o hospedeiro, indo desde a prevenção até a causa da doença. As bactérias do Complexo Vermelho (*Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*) são frequentemente encontradas em bolsas periodontais profundas (Suzuki et al., 2013; Gomes et al., 2015), sendo essas espécies ainda mais virulentas quando em interação sinérgica entre si (Ng et al., 2016).

Foi relatado que a placa subgengival contém aproximadamente 350 espécies bacterianas cultiváveis sendo que por volta de 100 delas podem ser encontradas em amostras de um único indivíduo (Consensus report, 1996; Berber, 2009).

A literatura a respeito da influência da doença periodontal sobre o tecido pulpar ainda é controversa, embora a transmissão de doença da polpa para os tecidos periodontais seja possível, através das vias de comunicação, e bem comprovada (Bergenholtz & Lindhe, 1978; Walton & Torabinejad, 1997; Harrington et al., 2002; Aqrabawi & Jarbawi, 2004; Carrote, 2004; Toledo & Rosetti, 2005; Berber, 2009; Duque, 2013, 2016; Chapola, 2017).

Vários estudos propõem que o efeito da doença periodontal na polpa é degenerativo por natureza, causando alterações como calcificações, fibroses, reabsorção do colágeno, hiperemia pulpar, reação inflamatória crônica ou até mesmo necrose são possíveis efeitos diretos da doença periodontal no tecido pulpar (Mandi, 1972; Pierce, 1998; Aguiar et al. 2002; Martin, 2003; Abbot & Salgado, 2009; Berber, 2009; Chapola, 2017). A polpa parece não ser severamente afetada pela doença periodontal até que o defeito exponha um canal lateral ou acessório ao meio bucal (Chapola, 2017). Nesse estágio, os patógenos da cavidade bucal, que penetram na polpa por meio do canal acessório, podem causar uma reação inflamatória, seguida pela necrose pulpar (Chapola, 2017). Entretanto, se a microvascularização do forame apical permanecer intacta, a polpa pode responder positivamente aos testes de sensibilidade (Seltzer et al., 1963; Bender & Seltzer, 1972; Czarnecki & Schilder, 1979; Torabinejad & Kiger, 1985; Adriaens et al., 1988).

Os mediadores inflamatórios presentes na placa e no cálculo subgengival

são liberados como resposta a estímulos nocivos da microbiota que compõe esse biofilme, podendo causar a destruição de todo aparato de inserção do dente, dentre as quais: alterações na superfície radicular, pela perda da camada externa de cementoblastos e reabsorção cementária. Além disso, as endotoxinas (LPS), presentes na membrana externa das bactérias Gram-negativas, também tem um efeito irritativo nos tecidos periodontais, comprometendo seu reparo (Chapola, 2017). A presença de uma superfície cementária sem alterações é extremamente importante para proteger a polpa dos agentes patogênicos, oriundos do biofilme subgengival. Uma vez que a continuidade dessa camada de cimento é rompida, através mesmo de procedimentos da terapia periodontal, como a raspagem e alisamento radicular, haverá a exposição de túbulos dentinários. Isso pode aumentar a probabilidade de danos cumulativos à polpa (Bergenholtz & Lindhe, 1978; Adriaens et al., 1988; Chapola, 2017).

Embora a polpa seja relativamente isolada do resto do complexo dento-alveolar por uma barreira de cimento, ela pode se comunicar com o ligamento através das vias de comunicação onde o cimento se encontra danificado (Duque, 2013, 2016). Pierce, em 1998, avaliou a resposta pulpar frente a vários estímulos. Ele concluiu que a reação pulpar pode variar dependendo da duração do agente causador e do tipo de injúria. Nenhuma correlação foi feita entre as injúrias e a vitalidade da polpa. Mas o autor observou a importância da injúria anterior com a capacidade da polpa em responder à uma injúria futura. A polpa modificada geralmente terá uma resposta comprometida para outras injúrias, devido a presença de fibrose, celularidade reduzida, vascularização, suprimento nervoso e calcificação distrófica, dessa forma, essas polpas clinicamente ainda são vitais, mas são menos capazes de responder diante de novos processos inflamatórios (Duque, 2013, 2016).

Duque et al. (2018) relataram que em casos com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário, que não respondem à terapia periodontal, observa-se um tecido pulpar com aspecto degenerativo e sangramento anormal durante o acesso coronal. Isso pode ser explicado pelo fato de que esse tecido foi exposto a um estímulo em baixa intensidade, o que causou lentidão e reação degenerativa crônica assintomática. No mesmo estudo detectou-se micro-organismos nos canais radiculares mesmo na presença de resposta positiva ao teste de

sensibilidade pulpar, fato que confirma que a alteração pulpar pode ocorrer como efeito da terapia periodontal, através da remoção de cimento e exposição das vias de comunicação entre o periodonto e a polpa.

2.5. Classificação das lesões endoperiodontais

As lesões endoperiodontais, também conhecidas como lesões endoperio, são caracterizadas por alterações patológicas com envolvimento pulpar e periodontal em um mesmo dente (Al-Fouzan, 2014; Solomon et al., 1995; Gomes et al., 2015). No entanto, este termo não distingue a fonte primária da lesão, que pode ser iniciada na polpa ou no periodonto.

Há um consenso geral de que a grande maioria das lesões pulpares e periodontais é resultado de infecção bacteriana. Sugere-se que uma doença pode ser o resultado, ou a causa da outra; ou até mesmo, originada de dois processos diferentes e independentes, associados ao seu desenvolvimento (Czarnecki & Schilder, 1979; Chapola, 2017).

Existem diferentes classificações para as lesões endodônticas-periodontais, dentre as quais se destaca a classificação de Simon e colaboradores, proposta em 1972. Essa classificação é fundamentada em como essas lesões são formadas, ou seja, de acordo com a causa primária da doença. Portanto, baseando-se na etiologia, diagnóstico, prognóstico e tratamento, a classificação de Simon et al., 1972 separa as lesões nos seguintes grupos:

1) Lesões endodônticas primárias:

Nesse tipo de lesão a necrose pulpar drena através do ligamento periodontal, na região do sulco gengival. Pode drenar, também, através do forame apical, canais laterais e acessórios, na região de furca. A bolsa periodontal que se forma é estreita e tem pouca, ou nenhuma relação com fatores locais, ou seja, com formação de biofilme subgengival. Radiografias com cones de guta percha são as ideais para detectar a origem da lesão. O tratamento endodôntico é o de escolha, levando à resolução completa e rápida da lesão periapical. Sendo assim, estas lesões possuem um excelente prognóstico.

2) Lesões periodontais primárias:

As lesões periodontais são causadas, primariamente, por patógenos periodontais. Nesse processo, a inflamação periodontal marginal crônica progride apicalmente ao longo da superfície radicular. O acúmulo de placa é frequentemente observado, e as bolsas são mais amplas. Lesões ósseas com perda óssea angular são comumente encontradas e estendem-se da região cervical até o ápice. As lesões podem não ser limitadas apenas a um dente e frequentemente envolvem os dentes adjacentes. Ao contrário das lesões endodônticas primárias, a ausência de crista óssea vestibular, lingual, ou ambas pode mostrar claramente a raiz e o canal ao nível da perda óssea. O clínico também deve estar atento ao aspecto radiográfico da doença periodontal associada à presença das anomalias radiculares de desenvolvimento. Na maioria dos casos, os testes de sensibilidade indicam clinicamente uma resposta pulpar normal. Esse é um teste importante para fazer distinção entre as condições da doença endodôntica primária e da lesão periodontal primária. A sondagem periodontal vai revelar bolsas mais amplas, que não se estendem necessariamente até o ápice. O prognóstico depende do estágio da doença periodontal e da eficácia do tratamento periodontal.

3) Lesões endodônticas primárias com envolvimento periodontal secundário:

Se uma doença endodôntica primária, com a presença de pus, permanecer sem tratamento por determinado período de tempo, pode ser tornar responsável, secundariamente, pelo rompimento do periodonto marginal. A placa é encontrada na margem gengival de uma fístula isolada, que leva à inflamação periodontal marginal. Quando a placa ou cálculo estão presentes, o tratamento e prognóstico são diferentes daqueles do dente afetado apenas pela doença endodôntica primária. Os dentes adjacentes não são necessariamente acometidos. Um espessamento evidente do espaço do ligamento periodontal do dente afetado pode ser observado, da região apical à cervical. Os testes de sensibilidade normalmente revelam resposta negativa. Uma bolsa isolada, porém, ampla, é normalmente encontrada, estendendo-se até o ápice. O dente afetado necessita tanto de tratamento endodôntico, quanto periodontal. Se o tratamento endodôntico for adequado, o prognóstico depende da gravidade da lesão marginal periodontal e da eficácia do tratamento. Com o tratamento endodôntico

isolado, apenas a parte da lesão que é de etiologia endodôntica irá cicatrizar até o nível da lesão periodontal secundária. Um quadro similar pode ocorrer também como resultado de uma perfuração radicular, durante o tratamento endodôntico, ou por pinos e núcleos intrarradiculares mal posicionados, durante a restauração da coroa. Algumas vezes os sintomas podem ser agudos, incluindo formação de abscessos periodontais associados à dor, edema, exsudato purulento, formação de bolsas periodontais e mobilidade dentária. Pode ocorrer também uma resposta crônica sem a presença de dor, envolvendo o aparecimento rápido de uma bolsa periodontal, apresentando sangramento à sondagem ou exsudato purulento. As fraturas radiculares também podem simular o aspecto da lesão endodôntica primária com envolvimento periodontal secundário. Isso ocorre, principalmente, em dentes tratados endodonticamente com núcleos intrarradiculares e coroas protéticas. Os sinais podem variar desde a presença de uma bolsa periodontal localizada até a formação de abscessos periodontais mais agudos.

4) Lesões periodontais primárias com envolvimento endodôntico secundário:

A progressão de uma bolsa periodontal pode continuar até os tecidos apicais serem envolvidos. Nesse caso, a polpa pode se tornar necrótica, como resultado da infecção pela penetração bacteriana via canais laterais ou forame apical. As bactérias, oriundas da bolsa periodontal, podem ser a fonte da infecção do canal. Uma forte correlação entre a presença de micro-organismos nos canais radiculares e sua presença em bolsas periodontais, em sítios com periodontite avançada, tem sido demonstrada, indicando que patógenos similares podem estar envolvidos em ambas as doenças. Enquanto o suprimento neurovascular da polpa permanecer intacto, as perspectivas de sobrevida são boas. Se esse suprimento for perdido pela doença periodontal, a necrose provavelmente irá ocorrer. As lesões ósseas, associadas à perda óssea angular, são geralmente encontradas e estendem-se da região cervical até o ápice. A periodontite generalizada ou o envolvimento periodontal dos dentes adjacentes é comum. Sintomas associados à dor, oriunda de uma polpa inflamada, são comuns nos estágios iniciais da doença. Com a evolução da doença, é esperado que a polpa perca sua vitalidade. As complicações do tratamento podem levar também ao envolvimento endodôntico secundário. Canais laterais e túbulos dentinários podem estar abertos ao ambiente bucal devido à curetagem, raspagem, ou procedimentos

cirúrgicos peridontais. É possível que um vaso sanguíneo do canal lateral seja lesionado, durante os procedimentos periodontais, e que facilite a entrada de microorganismos para o interior do canal radicular, resultando, assim, em inflamação e necrose pulpar. Os testes de sensibilidade vão revelar uma resposta anormal ou completamente ausente. A sondagem mostra uma bolsa profunda que se estende apicalmente, não se estendendo necessariamente até o ápice. Em dentes unirradiculares o prognóstico geralmente é sombrio. Nos molares, o prognóstico pode ser melhor, desde que todas as raízes não sofram a mesma perda de tecidos de suporte. Em tais casos, a ressecção radicular pode ser considerada como uma alternativa de tratamento.

5) Lesões endoperidontais combinadas verdadeiras:

Ocorrem em dentes acometidos por uma patologia endodôntica, que progride coronariamente e que possuem uma bolsa periodontal infectada, que progride apicalmente. O grau da perda de suporte nesse tipo de lesão é alto. Áreas de radiolucidez óssea extensa, de origem endodôntica e periodontal, podem ser encontradas associadas ao dente afetado. Isso se deve à natureza de longa duração dessa condição. Dependendo do estágio da doença, a lesão pode ou não se comunicar. A apresentação radiográfica pode ser semelhante à de um dente com fratura vertical. A elaboração do diagnóstico diferencial correto é essencial. Os testes de sensibilidade vão revelar ausência completa de resposta, e sondagem mostrará uma bolsa profunda e cônica, característica da doença periodontal. O prognóstico é frequentemente desfavorável. Isso é particularmente verdadeiro para dentes unirradiculares. Em molares, a ressecção radicular pode ser considerada como alternativa para o tratamento, se apenas algumas das raízes forem severamente envolvidas. Na maioria dos casos, a cicatrização periapical pode ser antecipada após o tratamento endodôntico adequado. Os tecidos periodontais, entretanto, podem não responder bem a esse tratamento, e os resultados dependem da gravidade da condição.

A Academia Americana e a Federação Europeia de Periodontia, em 2017, introduziram uma classificação atualizada das doenças periodontais com uma nova classificação da doença, incluindo as condições peri-implantares. Além disso,

discutiram o fato de que o termo "lesões endo-periodontais combinadas" utilizado até então era um termo genérico e não suficientemente elucidativo a ponto de orientar os clínicos na determinação do tratamento mais efetivo para a doença.

Herrera et al. (2018) propuseram uma nova classificação das lesões endo-periodontais baseada em sinais e sintomas passíveis de serem avaliados no momento em que a lesão for detectada e que apresentam impacto direto no tratamento, tais como presença ou ausência de fraturas e perfurações, presença ou ausência de periodontite e extensão da destruição periodontal ao redor do dente afetado.

2.5.1. Características clínicas que auxiliam na classificação das lesões endoperiodontais

É de suma importância no diagnóstico das lesões combinadas, estabelecer se a lesão inicial é de origem endodôntica ou periodontal (Stallard, 1972; Fachin et al., 2001; Anand & Nandakumar, 2005; Berber, 2009). É necessário obter informações sobre duração, intensidade e frequência da dor, pois, em geral, a doença periodontal é um processo crônico e generalizado com pouca ou nenhuma dor, enquanto que as lesões pulpares e periapicais são localizadas e mais associadas à dor aguda (Berber, 2009).

A análise radiográfica também é de extrema importância no diagnóstico diferencial, pois as lesões periodontais geralmente apresentam perda óssea angular estendendo-se da região cervical ao ápice radicular, enquanto que as lesões periapicais comprometem a região apical (Berber, 2009). As lesões endoperio totalmente desenvolvidas podem apresentar um quadro radiográfico similar, tornando o diagnóstico diferencial um desafio (Peeran et al., 2013).

A diferenciação entre lesões de origem endodôntica e lesões periodontais depende amplamente dos testes de sensibilidade pulpar (idealmente, tanto térmico quanto elétrico), sondagem periodontal, palpação, percussão, testes de mobilidade, transiluminação do dente, e remoção de restaurações existentes (Christie & Holthius, 1990; Berber, 2009; Abbott & Salgado, 2011; Chapola, 2017).

Os métodos usados para avaliar a vitalidade pulpar são suscetíveis a

resultados falso-positivo, isto é, uma resposta positiva a partir de uma polpa necrótica; e falso-negativo, isto é, uma resposta negativa a partir de uma polpa vital (Peterson et al., 1999; Duque, 2013, 2016).

As limitações dos testes pulpares são questionadas, pois a presença ou ausência de tecido pulpar pode ser determinada com alguns graus de confiança em dentes unirradiculares (Duque, 2013). Em dentes multirradiculares, pode haver tecido pulpar vital em um ou mais canais enquanto uma infecção parcial, ou seja, uma necrose parcial da polpa pode já ter acontecido em outros canais (Harrington, 1979).

Becerra et al. (1993) avaliando o estado pulpar, pelo teste de vitalidade, de dentes hígidos, mas com doença periodontal avançada, encontraram uma resposta negativa em 46,15% dos casos, demonstrando a existência de uma relação entre a patologia periodontal avançada e o comprometimento pulpar. Essa relação foi maior em pacientes com periodontite de aparecimento precoce, o que indicaria uma influência da agressividade da doença periodontal no dano pulpar. Segundo Cardon et al. (2007), quanto maior for a perda de inserção periodontal, menor é a resposta pulpar ao teste elétrico.

A sondagem periodontal pode mostrar que defeitos originários de uma lesão periodontal são geralmente amplos e não se estendem até o ápice radicular, enquanto que os de origem endodôntica em geral são estreitos e se estendem até o forame ou até as aberturas dos canais laterais (Berber, 2009).

Entendendo melhor a patogênese, o clínico pode oferecer o tratamento adequado e fazer uma estimativa do prognóstico (Al-Fouzan, 2014).

2.6. Aspectos microbiológicos das lesões endoperiodontais

A cavidade oral é caracterizada por uma microbiota complexa composta por, aproximadamente, 600 espécies de micro-organismos documentados pelo Human Oral Microbiome Database (HOMD) (Dewhirst et al., 2010).

Processos patológicos endodônticos e periodontais periodontal, desenvolvem-se em lugares onde um biofilme já está estabelecido (Nair, 1987; Belibasakis et al., 2015; Gomes et al., 2013; Chapola, 2017). Define-se biofilme como

uma comunidade de micro-organismos, aderidos à uma superfície sólida, além disso, é a forma padrão de crescimento de procariontes em seu ambiente natural. O crescimento bacteriano na forma planctônica ocorre somente em bactérias adaptadas a viver em ambientes com concentrações extremamente baixas de nutrientes. Outra importante propriedade que essa forma de organização microbiana confere é a resistência a forças físicas, que removeriam com facilidade células apenas aderidas a uma superfície (Chapola, 2017).

Muitos fatores afetam o crescimento e a colonização microbiana em canais radiculares e bolsas periodontais, tais como: concentração de nutrientes disponíveis, baixa tensão de oxigênio, principalmente em canais radiculares necrosados e o tipo e as combinações microbianas presentes no momento (Oliveira et al., 2005; Gomes, 2002).

Canais radiculares e bolsas periodontais infectadas apresentam semelhanças na microbiota (Duque, 2013; Gomes et al., 2015; Duque, 2016; Duque et al., 2018; Chapola, 2017). Abbott & Salgado (2001) mostraram que 30-60% da microbiota de bolsas periodontais são espiroquetas enquanto 0-10% estão presentes em canais infectados. Portanto, as similaridades entre a microbiota endodôntica e periodontal podem sugerir uma infecção cruzada entre o canal radicular e a bolsa periodontal (Zehnder, 2001).

Rupf et al. (2000) investigaram o perfil de patógenos periodontais em doenças pulpares e periodontais que afetam o mesmo dente, para tal utilizaram o método específico de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para detectar sete agentes patogênicos, sendo eles: *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Bacteroides forsythus*, *Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis*. As mesmas espécies foram encontradas em amostras de doenças endodônticas e de doenças periodontais. Diante disso os autores concluíram que os patógenos periodontais acompanham as infecções endodônticas e que a inter-relação dessas patologias são a via crítica para ambas.

Os bacilos produtores de pigmentos negros (BPPN) são os micro-

organismos mais pesquisados. Estes são bastonetes Gram-negativos, anaeróbios estritos e imóveis que, quando cultivados sobre a superfície de ágar sangue, desenvolvem colônias pigmentadas de negro por produzirem pigmentos do tipo protohemina ou protoporfirina. Importantes nas infecções orais, possuem um papel principal na patogênese da doença periodontal e infecções endodônticas. Eles são comumente isolados em combinação com outras bactérias, compondo infecções mistas. Evidências sugerem a existência de sinergismo bacteriano, que seria um fator determinante do potencial patogênico destas espécies (Baumgartner, 2002; Nisengard & Newman 1997; Duque, 2013, 2016).

Existem mais espécies de micro-organismos em bolsas periodontais do que em sistemas de canais radiculares infectados e, a microbiota de canais radiculares infectados que apresentam doença periodontal concomitante é mais complexa do que em dentes com patologia confinada apenas à região periapical. Assim, a bolsa periodontal pode ser uma fonte de bactérias para o canal radicular ou vice-versa (Abbott & Salgado, 2009; Berber, 2009; Duque, 2013, 2016; Gomes et al., 2015; Chapola, 2017).

Kipioti et al. (1984) avaliaram a microbiota periodontal e endodôntica de 6 dentes necrosados, com coroas intactas, sem lesões periapicais e com bolsas periodontais profundas, demonstraram que a microbiota de canais radiculares era similar àquela encontrada na adjacência das bolsas periodontais. Os organismos mais frequentemente isolados em ambos os locais foram *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Peptostreptococcus* spp., *Capnocytophaga* spp., *Actinomyces* spp e *Streptococcus* spp. Os autores ressaltaram que a bolsa periodontal era a possível fonte de infecção dos canais radiculares.

Kobayashi et al. (1990) observaram que dentes com necrose pulpar associada a bolsas periodontais de 6 a 12mm de profundidade que atingiam o forame apical, apresentavam micro-organismos anaeróbios comuns a ambos os sítios sendo predominantes *Peptostreptococcus*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Bacteróides* e *Streptococcus*. Kerekes & Olsen (1990), também detectaram similaridade entre as microbiotas endodôntica e periodontal de dentes sem lesão periapical, mas com comprometimento periodontal (Duque, 2013).

Kurihara et al. (1995) pesquisaram a microbiota dos canais radiculares de dentes necrosados e sem cárie aparente e de bolsas periodontais de 5 pacientes. Os autores encontraram maior prevalência de micro-organismos nas bolsas periodontais quando comparadas com os canais radiculares, sendo que a microbiota das bolsas periodontais consistia principalmente por bacilos e cocos. Espiroquetas foram encontradas apenas nas bolsas periodontais. As espécies bacterianas mais encontradas nos canais radiculares foram *Peptostreptococcus* e *Streptococcus* (cocos Gram-positivos) e *Actinomyces* e *Rothia* (bacilos Gram-positivos). As bactérias mais encontradas nas bolsas periodontais foram bastonetes anaeróbios facultativos e obrigatórios (Gram-negativos e positivos), *Campylobacter spp*, *Fusobacterium spp*, *Peptostreptococcus productus* e *Peptostreptococcus spp*, *Porphyromonas gingivalis*, *Streptococcus mutans* e *Streptococcus spp*. (Duque, 2013; Chapola, 2017).

Berber (2009) identificou a microbiota dos canais radiculares infectados e bolsas periodontais pelos métodos de cultura e PCR nas diferentes fases do tratamento endodôntico. O DNA bacteriano das amostras foi extraído e “primers” específicos para *Treponema denticola*, *Treponema socranskii*, *Gemella morbillorum*, *Tannerella forsythia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermédia*, *Prevotella tanneriae*, *Prevotella nigrescens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Filifactor alocis*, *Parvimonas micra* foram utilizados para detecção destas espécies por PCR. Os resultados mostraram que canais radiculares e as bolsas periodontais apresentaram-se infectados com uma combinação de espécies de micro-organismos formada principalmente por bactérias anaeróbias estritas e facultativas Gram positivas. o preparo químico-mecânico foi o grande responsável pela redução microbiológica do interior dos canais radiculares de dentes com comprometimento endo-periodontal. Além disso as medicações intracanal testadas por 7 e 14 dias não foram capazes de alterar ou interferir na microbiota da bolsa periodontal adjacente.

Duque (2013) investigou a influência do tratamento endodôntico em 15 dentes de pacientes com doença periodontal crônica, através da análise microbiológica por PCR, quantificação de endotoxinas e monitoramento de citocinas pró inflamatórias em bolsas periodontais e canais radiculares após o uso de uma medicação intracanal à base de hidróxido de cálcio. O uso da medicação intracanal

por 30 dias diminuiu a concentração do LPS e de citocinas inflamatórias nos canais radiculares e bolsas periodontais.

Gomes et al. (2015) investigando a microbiota de dentes com lesões endoperiodontais através da cultura microbiológica e do Next Generation Sequencing observaram que a comunidade microbiana presente nestas lesões combinadas é complexa e mais diversa do que a relatada anteriormente. Também relataram que bactérias sobrevivem em alguns canais radiculares após o PQM. Finalmente, que a similaridade entre a microbiota de ambos os locais, antes e após o preparo químico-mecânico, pode sugerir que existe uma via de infecção entre a polpa e o periodonto.

Duque (2016) investigou e correlacionou o conteúdo microbiológico em bolsas periodontais e canais radiculares de 32 dentes com doença periodontal e resposta pulpar positiva que estavam sob tratamento periodontal por no mínimo 6 meses, através do PCR simples e do sequenciamento do gene 16S rRNA. As amostras foram coletadas em três diferentes momentos da terapia endodôntica: antes do tratamento endodôntico, após PQM, e após MIC à base de hidróxido de cálcio por 30 dias. O estudo mostrou que as microbiotas de BP e CR são diferentes e a presença da MIC foi eficaz na redução dos níveis de LPS e bactérias nas bolsas periodontais e canais radiculares.

Chapola (2017) avaliou a presença de microrganismos periodontopatogênicos e quantificou os níveis endotóxicos, em canais radiculares e bolsas periodontais, de dentes com lesões endoperiodontais combinadas e a suscetibilidade destes microrganismos ao preparo químico-mecânico e à medicação intracanal em ambos os sítios, através da cultura microbiológica (contagem de unidade formadora de colônias, UFC), Nested-PCR e LAL pyrogen 5000 (endotoxina). Os dois sítios investigados apresentaram-se contaminados com potentes periodontopatógenos. PQM e o uso MIC por 30 dias foram altamente eficazes em reduzir os níveis endotóxicos nos CR e nas BP associadas. Embora a redução microbiana nas BP, após o uso da MIC não tenha sido tão significativa, seu uso se mostrou bastante eficaz em reduzir os níveis de LPS.

A relevância dos micro-organismos no desenvolvimento e perpetuação das

patologias pulpares e periapicais está elucidado na literatura (Takehashi et al., 1965; Gomes et al., 1996; Siqueira & Rôças 2007; Rahimi et al., 2014; Barbosa-Ribeiro et al., 2016). Desta maneira, é possível observar semelhanças entre a microbiota presente no sistema de canais radiculares e nos tecidos periodontais (Zehnder, 2001; Zehnder et al., 2002; Gomes et al., 2015), usando a cultura microbiana e métodos moleculares. Os métodos moleculares apresentam vantagens em relação aos procedimentos de identificação bacteriana baseados em características fenotípicas (cultura), como: maior sensibilidade e especificidade, e a capacidade de identificar bactérias incultiváveis (Munson et al., 2002; Siqueira & Rôças, 2005), gerando resultados mais confiáveis em relação ao conteúdo microbiano.

2.7. Métodos moleculares de identificação microbiana – Nested PCR e *Checkerboard DNA-DNA hybridization*

Métodos moleculares de identificação microbiana têm sido amplamente utilizados em pesquisas na área de microbiologia aplicada à odontologia (Munson et al., 2002; Sedgley et al., 2005; Siqueira & Rôças, 2005ab; Gomes et al., 2006ab; Sakamoto et al., 2006; Vianna et al., 2008; Subramanian & Mickel, 2009; Endo et al., 2013), como o PCR e suas variações (Nested PCR), *Checkerboard DNA-DNA hybridization*, clonagem e sequenciamento (*Next Generation Sequencing*). O Nested PCR é uma variação da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) simples, que consiste na realização de reações de amplificação subsequentes com 2 conjuntos de primers. A primeira reação é feita com primers universais para promover a amplificação do gene 16S rRNA das bactérias presentes, a partir do DNA extraído das amostras. O produto desta reação é submetido a uma segunda reação de amplificação, utilizando primers espécie-específicos, que irão se anelar a uma sequência interna do primeiro fragmento gerado pela reação universal (Willis et al., 1999; Baumgartner et al., 2003; Gomes & Montagner, 2010). O Nested PCR é um método altamente sensível (Rotstein et al., 2006), capaz de detectar quantidades muito pequenas de DNA bacteriano, mostrando eficácia em estudos anteriores realizados em nosso laboratório, investigando infecções endodônticas primárias com necrose pulpar e sem envolvimento periodontal e infecções endodônticas secundárias (Gomes et al., 2005; 2006ab, 2007; 2008ab; Montagner et al., 2010; Nóbrega et al., 2013; Endo et al., 2013; Rosa et al., 2015). Desta forma, faz-se interessante utilizar o

mesmo método para fins de comparação com as outras condições pulpares/periapicais, devido a sua comprovada eficiência. A técnica do *Checkerboard DNA-DNA hybridization* (ou hibridização DNA-DNA) foi descrita inicialmente em 1994 por Socransky e colaboradores. Caracteriza-se por ser de rápida execução, sensibilidade adequada e custo relativamente baixo, superando várias limitações de abordagens que empregam a cultura microbiana para o estudo das comunidades presentes em amostras clínicas (Sakamoto et al., 2006; Socransky et al., 2004) relatam ainda que a amostra, em sua totalidade, pode ser empregada, não havendo necessidade de amplificação prévia por PCR. Este método permite a hibridização, em um mesmo momento, de 28 amostras frente a 40 diferentes sondas de DNA bacteriano. Ao permitir a detecção da ocorrência de várias espécies em uma mesma reação, seu emprego torna-se interessante em estudos epidemiológicos (Siqueira et al., 2001). No nosso laboratório este método foi usado com sucesso nos trabalhos de Vianna et al. (2008) e Martinho et al. (2014), permitindo a quantificação dos níveis bacterianos nas diversas etapas do tratamento endodôntico. Entretanto tal monitoramento ainda não foi feito na microbiota de canais radiculares e de bolsas periodontais de dentes com doença periodontal crônica primária e envolvimento endodôntico secundário, como é o caso do presente estudo.

2.8. Endotoxinas e exotoxinas em infecções endodônticas e periodontais

Por apresentarem constituição polimicrobiana, as infecções endodônticas contêm bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, que apresentam fatores de virulência capazes de iniciar e manter um processo inflamatório apical (Gomes et al., 2013). Os micro-organismos presentes nas infecções endodônticas apresentam diferentes fatores de virulências, os quais são constituídos de componentes bacterianos estruturais e produtos secretados pelos micro-organismos. Dentre os componentes estruturais das bactérias podemos citar principalmente os lipopolissacarídeos (LPS, presentes somente em bactérias Gram-negativas), peptidoglicanos, ácidos lipoteicóicos (LTA, presentes somente em bactérias Gram-positivas), fímbrias, proteínas e vesículas de membrana externa, lipoproteínas, flagelos, DNA bacteriano e exopolissacarídeos (Gomes et al., 2013). Os principais componentes microbianos responsáveis por promover alterações ao sistema imunológico do hospedeiro são o LTA e o LPS.

O ácido lipoteicoico (LTA) é um componente da membrana celular de bactérias Gram-positivas, apresentando-se como um dos principais fatores de virulência deste grupo de micro-organismos (Hahn et al., 2007; Ribeiro-Barbosa et al., 2016). LTA pode promover a ativação de macrófagos/monócitos e induzir a liberação de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 e prostaglandinas (Siqueira & Rôças, 2007; Wang et al., 2003; Hahn et al., 2007) e pode ativar o sistema complemento (Ginsburg, 2002; Siqueira & Rôças, 2007). Enquanto o LTA é um dos principais componentes que confere virulência às bactérias Gram-positivas, o lipopolissacarídeo (endotoxina ou LPS) é um dos constituintes da membrana externa da parede celular das bactérias Gram-negativas (Rietschel & Brade, 1992). O LPS é liberado durante o processo de divisão e lise celular, ou ainda diante do tratamento químico celular na tentativa de sua remoção (Fabricius et al., 1982). As endotoxinas são capazes de invadir os tecidos periapicais (Rietschel & Brade, 1992), atuando na patogênese da inflamação pulpar e periapical, incluindo a reabsorção óssea (Seltzer & Farber, 1994; Martinho & Gomes 2008; Oliveira et al., 2012, Martinho et al., 2017).

Quimicamente LPS são constituídos de uma porção "Lípideo A", Core oligossacarídeo (polissacarídeos) e Antígeno O (Chapola, 2017). 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 (Chapola, 2017). 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; Marinho, 2016; Chapola, 2017).

Estudos clínicos demonstraram a presença de LPS bacteriano em 100% dos canais radiculares de dentes com infecção endodôntica primária e presença de lesão periapical (Jacinto et al., 2005; Vianna et al., 2007; Martinho & Gomes, 2008; Gomes et al., 2009; Martinho et al., 2010, 2011), e também em dente com insucesso do tratamento endodôntico (Gomes et al., 2012), sugerindo sua participação na patogênese de lesões periapicais.

Endotoxinas são capazes de estimular a liberação de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1- β , IL-6, TNF- α e PGE₂, por diferentes linhagens celulares (Wilson et al., 1996; Martinho et al., 2010, 2011b, 2012). A rede de citocinas produzidas revela sua complexa atividade antigênica e o padrão de resposta imune/inflamatória pulpar e perirradicular gerado foi determinado pelo potencial inflamatório do conteúdo infeccioso (Homji et al., 2012). Segundo Minabe et al. (1994), na doença periodontal, a maioria dos LPS fica aderida superficialmente na porção radicular e pode ser removida através do polimento radicular. As endotoxinas residuais, que ficam na superfície radicular, podem ser toleradas ou neutralizadas pelos mecanismos de defesa do hospedeiro. Em seu trabalho, eles observaram que a endotoxina pode ser removida, atingindo taxas de até 99,2%. No entanto, o polimento por si só pode ser insuficiente, sendo necessário a utilização de alguma substância química para eliminação total do LPS.

Estudos mostraram que a endotoxina se adere fracamente à superfície radicular e não penetra profundamente no cimento. Além disso, alisamento radicular excessivo pode levar a remoção completa de cimento e parece ser desnecessária, uma vez que evita a sensibilidade pulpar (Nakib et al., 1982; Nyman et al., 1988; Lowenguth & Greenstein, 1995; Duque, 2016).

Liu et al. (2002) mostraram que partículas de cimento, coletadas de dentes comprometidos com doença periodontal, apresentaram quantidades significativas de endotoxinas. Dessa forma, o LPS atuaria como um potente estimulador de células inflamatórias tendo como consequência a destruição óssea periodontal (Duque, 2016).

Jacob et al. (2012), avaliaram níveis de endotoxina na circulação sanguínea de pacientes com periodontite crônica, através do ensaio semi quantitativo LAL, imediatamente após processos de raspagem e alisamento radicular. Os autores observaram um aumento significativo nos níveis sanguíneos de endotoxina 15 minutos após a terapia periodontal. Touyz, em 2013, demonstrou que periodontites com bolsas ativas de 7 mm, ou mais, permite o ingresso de endotoxinas para a circulação sanguínea derivada, contribuindo para o aparecimento de choque séptico.

2.9. Preparo químico-mecânico e uso de medicação intracanal na redução de micro-organismos

Se por um lado o tratamento endodôntico é indicado diante da presença de uma infecção intrarradicular, favorecendo o reparo periodontal, mesmo nos casos em que o tratamento periodontal já tenha sido iniciado (Kwon et al., 2013, Gomes et al., 2015; Chapola, 2017), a literatura ainda é limitada no que se diz respeito a indicação do tratamento endodôntico nos casos de lesão periodontal primária com envolvimento endodôntico secundário em dentes que não responderam à terapia periodontal (Duque, 2013, 2016; Duque et al., 2018). É possível que o uso de uma medicação intracanal à base de hidróxido de cálcio possa modificar o perfil microbiológico e endotóxico presente nas bolsas periodontais, favorecendo o prognóstico do dente, uma vez que o canal radicular pode ser considerado um reservatório para o uso da mesma (Gomes et al., 2015; Duque, 2013, 2016; Duque et al., 2018).

O tratamento endodôntico de alta qualidade por meio de instrumentação e de irrigação dinâmica (Vianna et al., 2007; Gomes et al., 2009b; Gomes et al., 2012; Marinho et al., 2015; Gomes et al., 2015; Barbosa-Ribeiro et al., 2016; Duque et al., 2018) é essencial para uma maior taxa de sucesso do resultado do tratamento em geral. Além disso, a clorexidina (CLH) gel mostrou ser uma substância química auxiliar endodôntica eficaz, particularmente devido à sua ação antimicrobiana e sua adsorção aos tecidos duros dentários com liberação gradual e prolongada em níveis terapêuticos (Substantividade) (Abbott et al., 2009; Gomes et al., 2009a; Gomes et al., 2013). Do ponto de vista clínico, a CLH gel demonstrou alta eficácia na remoção de LPS bacteriano associado à instrumentação dos canais radiculares (Gomes et al., 2013; Marinho et al., 2015).

Herrera et al. (2017) investigaram a influência da ativação ultrassônica do EDTA, após o preparo químico-mecânico, em reduzir a concentração de endotoxinas e o número de bactérias cultiváveis, em dentes com necrose pulpar e periodontite apical. Amostras foram coletadas de vinte e quatro canais radiculares, antes e após o preparo químico mecânico, e após irrigação com EDTA 17%, sendo que nessa última coleta, os dentes foram divididos em dois grupos: grupo I – ativação ultrassônica do EDTA; grupo II – sem ativação ultrassônica. Os dentes foram instrumentados com a utilização de instrumentos rotatórios do sistema Mtwo. A técnica de cultura microbiológica foi utilizada para se determinar o número das Unidades Formadoras de Colônias. Limulus Amebocyte Lysate (LAL) foi utilizado para se quantificar as endotoxinas. Os resultados desse trabalho detectaram a presença de bactérias e endotoxinas em 100% dos canais radiculares necrosados, antes de realizados os procedimentos biomecânicos. A ativação ultrassônica do EDTA 17% resultou em redução significativa dos níveis endotóxicos, porém, não houve diferença estatisticamente significativa ao comparar a redução bacteriana nos grupos analisados. A partir dos resultados, os autores afirmam que a ativação ultrassônica do EDTA 17% é eficaz em reduzir a concentração de endotoxinas no interior de canais radiculares de dentes infectados.

Embora as medicações intracanaís não substituam o preparo químico-mecânico, seu emprego como coadjuvante em situações clínicas específicas é indicado (Siqueira & Lopes, 1999; Duque, 2013; Barbosa-Ribeiro et al., 2016; Duque, 2016; Barbosa-Ribeiro et al., 2018; Duque et al., 2018; Martinho et al., 2018). Alguns autores consideram o uso de uma medicação intracanal de grande importância para o tratamento endodôntico (Abbott & Salgado 2009; Duque, 2013; Barbosa-Ribeiro et al., 2016; Duque, 2016; Barbosa-Ribeiro et al., 2018; Duque et al., 2018; Martinho et al., 2018).

A utilização do uso da MIC tem por finalidade, principalmente, reduzir ou eliminar ao máximo o conteúdo microbiano e endotóxico, resistentes ao PQM (Duque, 2013; Barbosa-Ribeiro et al., 2016; Duque, 2016; Barbosa-Ribeiro et al., 2018; Duque et al., 2018; Martinho et al., 2018). Entretanto, nenhuma MIC demonstra capacidade de eliminar completamente micro-organismos patogênicos, presentes no sistema de canais radiculares, principalmente nos casos de difícil resolução, como aqueles de

periodontite apical persistente, insucesso do tratamento endodôntico e flare-up (Bystrom et al., 1985; Orstavik & Haapasalo, 1990; Lopes & Siqueira, 2004; Duque, 2013; Barbosa-Ribeiro et al., 2016; Duque, 2016; Barbosa-Ribeiro et al., 2018; Duque et al., 2018; Martinho et al., 2018).

As medicações intracanaís mais utilizadas na endodontia são a base de hidróxido de cálcio [Ca(OH)_2] (Duque, 2013; Barbosa-Ribeiro et al., 2016; Duque, 2016; Barbosa-Ribeiro et al., 2018; Duque et al., 2018; Martinho et al., 2018). O Ca(OH)_2 tem um papel muito importante durante o tratamento endodôntico, sendo seu uso cada vez mais difundido como medicamento intracanal. As propriedades do Ca(OH)_2 derivam da sua dissociação em íons cálcio e hidroxila, os quais exercem ação sobre os tecidos e bactérias (Tanomaru-Filho et al., 2002). Seu efeito antibacteriano está ligado à inativação de enzimas bacterianas (Tanomaru-Filho et al., 2002). Já seu efeito mineralizador, está relacionado à sua capacidade de ativar enzimas que tem papel na formação de tecido duro (Estrela & Pesce, 1996; Tanomaru et al., 2003). Na busca por uma medicação que reúna o maior número de vantagens, o Ca(OH)_2 têm sido extensivamente estudado, tanto associado a veículos inertes, como a substâncias ativas. Foi provado que o coeficiente de dissociação do Ca(OH)_2 permite uma liberação lenta e controlada de ambos os íons, cálcio e hidroxila, que podem se difundir através dos túbulos dentinários (Carrote, 2004).

A baixa solubilidade e difusibilidade do Ca(OH)_2 necessita de um longo tempo de ação para que o medicamento exerça atividade antimicrobiana nos túbulos dentinários infectados. Embora o tempo ideal necessário para ele descontaminar o sistema de canais radiculares seja ainda desconhecido, sua ação antibacteriana pode ser confirmada, clinicamente, pela presença de micro-organismos resistentes ou ausência de exsudatos no canal radicular (Siqueira & Lopes, 1999).

A clorexidina gel é eficaz como medicação intracanal, devido ao seu amplo espectro antimicrobiano, baixa toxicidade e liberação gradual prolongada, além de reduzir o processo de reabsorção inflamatória (Lindskog et al., 1998; Ferraz et al., 2001; Gomes et al., 2006; Gomes et al., 2013). Entretanto, não funciona como barreira física dentro do canal, e sua difusão pelos túbulos dentinários resulta num espaço vazio, propício a recontaminação (Chapola, 2017). Quando associada ao Ca(OH)_2 ,

reduz sua atividade antimicrobiana, mas tal ação ainda é superior ao Ca(OH)_2 não associado. Dessa forma, a associação dessas duas substâncias melhora as propriedades antimicrobianas do Ca(OH)_2 (Gomes et al., 2003; Gomes et al., 2013).

Duque et al. (2018) investigaram os efeitos de um medicamento intracanal à base de hidróxido de cálcio sobre conteúdo infeccioso / inflamatório periodontal e endodôntico e sobre parâmetros clínicos periodontais em dentes com lesão periodontal e envolvimento endodôntico secundário que não respondiam à terapia periodontal. Os autores concluíram que o uso de uma medicação intracanal à base de hidróxido de cálcio por 30 dias mostrou efeitos positivos para o prognóstico do tratamento periodontal, uma vez que houve redução dos níveis de LPS, citocinas pró-inflamatórias e metaloproteinases em bolsas periodontais.

No entanto, pouco se sabe sobre a eficácia da medicação intracanal na redução microbiológica e dos níveis de LTA/LPS bacteriano presentes nos canais e nas bolsas periodontais de dentes com doença periodontal crônica. Dessa forma, o objetivo deste estudo clínico é avaliar a microbiota e quantificar os níveis de endotoxinas (LPS) e ácido lipoteicóico (LTA) em canais radiculares e bolsas periodontais de dentes com polpa vital associados a doença periodontal, que não responderam à terapia periodontal, antes e após o preparo químico-mecânico e após o uso de uma medicação intracanal por 30 dias.

3 PROPOSIÇÃO

Os objetivos do presente trabalho foram:

OBJETIVO GERAL:

O objetivo deste estudo clínico foi investigar a microbiota e quantificar os níveis de endotoxinas (LPS) e ácido lipoteicóico (LTA) antes (C1) e após (C2) o preparo químico-mecânico (PQM) e após o uso de uma medicação intracanal (MIC) à base de hidróxido de cálcio por 30 dias (C3) nas bolsas periodontais (BP) e canais radiculares (CR) de dentes com polpa vital associados a doença periodontal, que não responderam à terapia periodontal.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Os objetivos específicos deste estudo são:

- Caracterizar a microbiota das BP e CR através do Nested PCR e Checkerboard DNA-DNA hybridization;
- Avaliar o efeito das diferentes etapas do tratamento endodôntico na redução do conteúdo infeccioso das BP e CR;
- Comparar a sensibilidade dos diferentes métodos de identificação microbiana;
- Avaliar o efeito do preparo químico-mecânico e da medicação intracanal nos níveis de endotoxinas (LPS) nas BP e CR;
- Avaliar o efeito do preparo químico-mecânico e da medicação intracanal nos níveis de ácido lipoteicóico (LTA) nas BP e CR;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Comitê de Ética em Pesquisa

O projeto foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP), da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas (CAAE 86140218.0.0000.5418 – Anexo 1). Após a seleção dos pacientes, todos receberam explicações sobre os objetivos e procedimentos da pesquisa e todos os pacientes assinaram um termo de consentimento elaborado de acordo com as normas deste mesmo comitê (Anexo 2).

4.2. Seleção de pacientes

Inicialmente foram analisadas as fichas dos pacientes disponíveis dos Cursos de Atualização e Especialização de Periodontia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Foram selecionados 10 pacientes com dentes com vitalidade pulpar associados a doença periodontal com necessidade de intervenção endodôntica. Todos esses pacientes já estavam sob acompanhamento periodontal de no mínimo 6 meses. Esse acompanhamento periodontal foi realizado através de visitas periódicas com realização de raspagem supra e subgingivais. A faixa etária dos pacientes foi de 15 a 75 anos, independentemente do gênero. O tamanho da amostra utilizado no presente estudo baseou-se em estudo anterior envolvendo lesão periodontal primária com envolvimento endodôntico secundário (Duque et al., 2018). Os voluntários foram confirmados através de exames clínicos e radiográficos.

4.2.1. Critérios de inclusão e exclusão, aspectos clínicos e radiográficos:

Critérios de inclusão:

- Tratamento e acompanhamento periodontal prévio de no mínimo 6 meses e máximo de 1 ano.
- Mesmo após esse período de terapia periodontal, os dentes (molares, pré-molares, caninos e incisivos) apresentando pelo menos uma face do dente comprometida com bolsas periodontais residuais iguais ou maiores que 6 mm.

- Dentes que radiograficamente apresentem perda óssea extensa em uma das faces proximais, acompanhado ou não de sinais e sintomas clínicos.
- Dentes que clinicamente, através do teste térmico a frio, apresentem resposta positiva com sensibilidade prolongada ao teste de sensibilidade pulpar comparado ao dente contralateral (controle).
- Dentes que durante a terapia periodontal não apresentam nenhum tipo de resposta positiva à terapia, e a profundidade das bolsas aumentam gradativamente.

Critérios de exclusão:

Foram descartados deste estudo, pacientes que apresentaram dentes com grandes extensões de cárie, com câmara pulpar exposta ao meio bucal, com necrose pulpar, com trincas, calcificações, qualquer tipo de reabsorção e casos onde não foi possível acessar todo o comprimento do canal radicular. Pacientes fumantes, portadores de doenças sistêmicas (como por exemplo, diabetes melitus e AIDS) e com história de antibioticoterapia recente e uso de antifúngicos nos últimos 3 meses também não participaram deste trabalho.

Aspectos clínicos e radiográficos:

Para cada paciente foram registradas informações como: idade, sexo, história médica e dentária. Os aspectos físicos do canal durante a coleta da amostra, tais como canal seco, presença de exsudado, presença ou não de cáries e restaurações também foram registrados.

Quanto à sintomatologia, foi verificada a presença ou ausência de dor, natureza da dor, história de dor prévia, dor à percussão (horizontal e vertical) e à palpação. A condição pulpar foi verificada através do teste térmico a frio (Endo ice; The Hygienic Corporation, Akron, OH, EUA). Também foram anotados dados, tais como: presença ou ausência de edema dos tecidos periapicais, fístulas, mobilidade dental e bolsa periodontal.

A profundidade de sondagem (PS) e a recessão da margem gengival (RMG) foram mensuradas milimetricamente, com uma sonda sensível à pressão manual no local mais profundo do defeito interdental e realizada em todas as faces do dente envolvido (mesial, distal, vestibular e palatina/lingual). Todas as medidas foram verificadas com uma sonda periodontal manual sensível à pressão de 0,3 N da Hu-Friedy (MGF Co. Inc., Chicago, IL, EUA). O nível clínico de inserção (NCI) foi calculado como a soma do PS e RMG (Tonetti et al. 1993).

A avaliação do grau de mobilidade dentária foi realizada de acordo com Schluger et al., 1981 em: Grau 0 – Ausência de mobilidade; Grau I – Mobilidade clínica de aproximadamente 1 mm na direção vestibulo-lingual; Grau II - Mobilidade clínica de aproximadamente 2 mm na direção vestibulo-lingual e ausência de mobilidade apical; e Grau III - Mobilidade clínica de aproximadamente 2 mm na direção vestibulo-lingual e mobilidade apical.

A história médica/odontológica e as características clínicas e radiográficas, referentes ao paciente/dente investigado, foram anotadas na ficha clínica específica como descrito no apêndice 1.

4.3. Procedimentos clínicos e coleta das amostras dos canais radiculares e bolsas periodontais

O atendimento aos pacientes foi realizado na Clínica de Pós-Graduação da FOP-UNICAMP e as amostras processadas no Laboratório de Microbiologia Endodôntica.

Foram coletadas amostras iniciais, após o preparo químico-mecânico e após a medicação intracanal dos canais radiculares. As mesmas coletas também foram realizadas nas bolsas periodontais.

As coletas nas BP ocorreram nos seguintes momentos:

- Coleta Periodontal Inicial (CP1);
- Coleta Periodontal após PQM (CP2);
- Coleta Periodontal após MIC (CP3).

As coletas nos CR ocorreram nos seguintes momentos:

- Coleta Endodôntica Inicial (CE1);
- Coleta Endodôntica após PQM (CE2);
- Coleta Endodôntica após MIC (CE3).

As metodologias relacionadas às coletas e análises das amostras, utilizadas neste trabalho, foram baseadas em estudos prévios (Gomes, 1995; Gomes et al., 1994a, b; 1996, 2004; 2015, Martinho & Gomes 2007).

4.3.1. Detalhamento das coletas periodontais

Coleta Periodontal Inicial (CP1)

Inicialmente, o paciente realizou bochecho com CHX 0,12% (Periogard® Colgate-Palmolive Industrial Ltda, São Bernardo do Campo, SP). Alguns princípios foram observados na coleta das amostras: utilização de técnicas assépticas e promoção de um fácil acesso para a coleta das amostras, como a remoção de cálculo supragengival, realizada através de profilaxia prévia com pedra-pomes e taça de borracha e utilização de curetas periodontais, em todas as faces, evitando, dessa forma, uma contaminação proveniente do periodonto. Um jato de ar foi aplicado a fim de manter a superfície dental completamente seca.

Antes da coleta inicial, foi realizado o isolamento relativo do dente, com o auxílio de roletes de algodão, para minimizar a contaminação por saliva.

A coleta periodontal foi realizada na bolsa de maior profundidade de sondagem através de cones de papéis absorventes estéreis/apirogênicos (esterilizados através de calor seco, em estufa por um período de tempo de 30 min a 250°C) calibre FM (Dentsply - Petrópolis, RJ).

Inicialmente, um cone de papel absorvente apirogênico foi introduzido até o fundo da bolsa periodontal permanecendo por 1 minuto. Em seguida, esse cone foi removido e transferido para criotubos (Nest Biotechnology, Wuxi, China) e armazenados em freezer -80 °C. Essa primeira coleta foi destinada para a análise de

endotoxinas.

Posteriormente, 3 cones de papel absorvente estéreis, um de cada vez, foram introduzidos até o fundo da bolsa periodontal permanecendo por 1 minuto cada um. Esses cones foram transferidos para tubos do tipo *ependorfs* previamente esterilizados, contendo 1,0 mL do meio de transporte pré-reduzido VMGA III – Viability Medium Goteberg Agar (Dahlén et al., 1993) e transportados em jarros a vácuo para o Laboratório de Microbiologia da disciplina de Endodontia da FOP-UNICAMP. Esses *ependorfs* foram imediatamente congelados em freezer -80°C. Essa segunda coleta foi destinada para a análise microbiológica. Após a realização da coleta inicial da bolsa periodontal (CP1), o dente foi preparado para as coletas endodônticas.

Coletas Periodontais Posteriores (CP2 e CP3)

Com a remoção do isolamento absoluto, logo após finalização do preparo químico-mecânico e selamento provisório do dente com resina fotopolimerizável, uma nova coleta da bolsa periodontal (CP2) foi realizada como descrita na CP1.

Após 30 dias de medicação intracanal, os pacientes foram novamente atendidos e a medicação removida através de irrigação abundante solução salina estéril e novas coletas da bolsa periodontal foram realizadas (CP3).

4.3.2. Detalhamento das coletas dos canais radiculares

Coleta endodôntica inicial (CE1)

Alguns princípios foram preconizados para realização das coletas clínicas endodônticas, como: 1) Durante toda terapia endodôntica, foram utilizadas técnicas assépticas e instrumentos esterilizados e apirogênicos; 2) Remoção dos contaminantes coronários (cáries e restaurações defeituosas) e descontaminação do campo operatório; 3) Realização do isolamento absoluto; 4) Remoção de possíveis interferências, a fim de que o instrumento tenha um acesso fácil no comprimento pré-estabelecido.

Antes da intervenção, foi realizada a descontaminação da face do paciente com clorexidina gel 2% (Endogel TM, Itapetininga, SP, Brasil) e anestesia local na

região do dente envolvido. Inicialmente o dente envolvido recebeu polimento coronário com pedra-pomes e foi isolado com lençol de borracha (isolamento absoluto). A seguir, foi realizado o vedamento da interface coroa/lençol com cianoacrilato (Super Bonder; Loctite, SP-Brasil) e TopDam (FGM, Joinville, SC-Brasil), para evitar infiltração de saliva. A antisepsia do campo operatório (superfície externa da coroa, grampo, lençol de borracha e arco) foi realizada com auxílio de swabs estéreis umedecidos primeiramente em H₂O₂ a 30% (v/v) e depois em NaOCl 5,25% por 30 segundos cada, sendo subsequentemente neutralizado com solução estéril de tiosulfato de sódio a 5% (Möller, 1966).

Para a fase de abertura coronária, a água proveniente do equipo foi cessada, sendo a irrigação realizada manualmente com solução salina estéril e aprotogênica. Brocas de alta rotação diamantadas estéreis/aprotogênicas esféricas 1012HL, 1014HL, 1016HL e tronco cônica de ponta inativa 3082 (K.G. Sorensen Ltda, Barueri, SP, Brasil) foram utilizadas para a mesma. Na primeira etapa operatória foi realizada a remoção dos contaminantes coronários (restaurações, tecido cariado). Na segunda etapa, na fase de confecção da cavidade de acesso, uma nova broca estéril/aprotogênica foi utilizada. Antes que houvesse exposição pulpar nova desinfecção foi realizada com as mesmas soluções e neutralizadores citados anteriormente. Prosseguindo, com a remoção total do teto da câmara pulpar através de uma nova broca diamantada esférica estéril/aprotogênica.

Após a abertura coronária, uma lima K#10 foi utilizada para exploração inicial do canal radicular e a lima K#15 (Maillefer/Dentsply, Ballaigues, Suíça) levada ao comprimento do canal radicular, determinado na radiografia pré-operatória. Em seguida, o localizador apical era utilizado (VDW Gold Reciproc, Munique, Alemanha) para obter o comprimento real do canal radicular, equivalente a posição zero no localizador apical.

Para as coletas endodônticas, inicialmente foi realizada com um cone de papel absorvente estéril/aprotogênico calibre FM (Dentsply, Petrópolis, RJ, Brasil) foi introduzido no comprimento total do canal (determinado pela radiografia inicial) permanecendo por 1 minuto. Em seguida, esse cone era transferido criotubos e congelados em freezer -80 °C. Essa primeira coleta era destinada para a análise de

endotoxinas.

Posteriormente, 3 cones de papel absorvente estéreis, um de cada vez, foram introduzidos como descrito previamente para o canal radicular, permanecendo por 1 minuto cada um. Esses cones foram transferidos para tubos do tipo *ependorfs* previamente esterilizados, contendo 1,0 mL do meio de transporte pré-reduzido VMGA III – Viability Medium Goteborg Agar (Dahlén et al., 1993) e transportados em jarros a vácuo para o Laboratório de Microbiologia da disciplina de Endodontia da FOP-UNICAMP. Esses *ependorfs* foram congelados em freezer -80°C. Essa segunda coleta foi destinada para a análise microbiológica.

Nos casos de dentes multirradiculares, a amostra foi coletada do canal radicular associado a bolsa periodontal de maior profundidade, de maneira a confinar o exame microbiológico, endotóxico e exotóxico a um único ambiente ecológico.

Uma vez realizada as coletas iniciais (CP1 e CE1), a câmara pulpar foi descontaminada com CLX gel 2% (Endogel TM, Itapetininga, SP, Brasil) e o preparo da entrada dos canais foi complementado com a realização dos desgastes compensatórios, utilizando a broca diamantada 3082 (K.G. Sorensen Ltda, Barueri, SP, Brasil).

Em seguida foi realizada a exploração do canal com lima K #10 (Maillefer/Dentsply, Ballaigues, Suíça). Assim como toda a instrumentação, a introdução do instrumento foi realizada por terços (coronal, médio e apical) até atingir o comprimento real de trabalho, com movimentos leves, inserindo e removendo a lima do canal radicular, evitando sempre qualquer força no sentido apical. Neste momento foi determinado a lima anatômica inicial (LAI), com auxílio de uma lima manual do tipo K, a qual determinou o diâmetro inicial do forame apical e confirmou novamente a patência e o comprimento real de trabalho. O preparo químico-mecânico foi realizado com o sistema recíprocante Reciproc (VDW, Munich, Germany) no motor endodôntico VDW Gold (VDW, Munique, Alemanha) correspondentes ao diâmetro de 3 limas subsequentes ao diâmetro inicial do forame apical (LAF), podendo quando necessário, utilizar uma lima manual do tipo K para complementar a instrumentação.

Durante todo o preparo químico-mecânico, uma lima de pequeno calibre foi

utilizada para manter a patência do canal e foi realizada abundante irrigação/aspiração. Após a instrumentação, foi confirmada a patência e os canais radiculares foram irrigados com solução específica (tween 80 + lecitina de soja) para neutralizar a ação da substância química auxiliar utilizada (CLX gel 2%).

O protocolo de irrigação foi finalizado com 5,0 ml de solução fisiológica. Foram inseridos 3,0 ml de EDTA 17% no interior do canal radicular por 3 minutos, sob agitação, com a finalidade de remover a camada residual e permitir a abertura dos túbulos dentinários para difusão da medicação intracanal. A irrigação final foi realizada com 10,0 ml de solução fisiológica estéril.

Coleta Endodôntica após PQM (CE2)

Após o PQM, nova coleta do canal radicular foi realizada (CE2), da mesma maneira que a CE1. A CE2 foi realizada após o uso do EDTA 17%.

Logo em seguida foi colocada uma medicação intracanal (MIC) na proporção de 3 medidas de hidróxido de cálcio pó para 0,2ml de clorexidina gel 2%, na consistência de uma pasta similar a de um creme dental, por 30 dias em todos os dentes. As cavidades de acesso foram restauradas com resina composta.

Coleta Endodôntica após MIC (CE3)

Após este período, os canais, então, foram irrigados com 10mL de solução fisiológica no intuito de remover a MIC e possibilitar a coleta do canal. Novas coletas para endotoxinas e avaliação microbiológica foram realizadas (CE3) como descritas anteriormente nas CE1 e CE2.

Para finalização do tratamento endodôntico, os canais foram reinstrumentados com uma lima manual K#15 ou K#20 (Maillefer/Dentsply, Ballaigues, Suíça) para remoção da medicação e irrigados com 5 mL de solução fisiológica. Os canais foram inundados com CLX gel 2% e a prova do cone foi realizada e confirmada radiograficamente. O EDTA 17% foi aplicado por 3 minutos sob agitação, com troca a cada 1 minuto.

A obturação do canal radicular foi realizada com cones de guta-percha

acessórios Fine Medium extra-longo e Medium (Konne Indústria e Comércio de Materiais Odontológicos Ltda., Belo Horizonte, MG) e cimento endodôntico Endomethasone (Septodont, Saint-Maur-des-Fossés Cedex, France), pela técnica do cone modelado apical, complementada com condensação lateral. Logo em seguida, o procedimento restaurador de todos os dentes foi realizado através da colocação de 2 mm de Coltosol (Vigodent, Coltene, Rio de Janeiro, RJ) na embocadura dos canais, aplicação de ácido fosfórico 37% por 15 segundos em toda a cavidade, adesivo 3M Single Bond (3M Dental Products, St. Paul, MN, EUA) e inserção de resina fotopolimerizável Z 350 (3M Dental Products, St. Paul, MN, EUA) pela técnica incremental. Ao final desse procedimento, foi realizada a radiografia final do tratamento endodôntico. Todos os pacientes da pesquisa foram aconselhados a retornar e continuar sob terapia de manutenção e acompanhamento periodontal. Um ano após a realização do tratamento endodôntico, os pacientes serão chamados para avaliação clínica e radiográfica.

4.4. Procedimentos laboratoriais

4.4.1. Identificação microbiana pelo método molecular - Nested PCR

As extrações de DNA dos dentes com polpa vital foram realizadas com o QIA amp DNA kit (QIAGEN, Valencia, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Após extração, a leitura da concentração de DNA presente nas amostras coletadas dos canais radiculares foi realizada a 260 nm através de espectrofotometria (Nanodrop 2000; Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA).

Inicialmente foi amplificada a região que abrange o gene 16S e 23S rRNA através dos Primers Universal:

Univ Forward (785) 16S 5' GGATTAGATACCCTGGTAGTC 3'

Univ Forward (L422) 23S 5' GGAGTATTTAGCTT 3'

As reações de PCR foram processadas na quantidade total de 50 µL para cada amostra contendo 5 µL de tampão para reação de PCR (10x Reaction Buffer, Invitrogen, São Paulo, São Paulo, Brasil); 5µL de uma mistura de deoxiribonucleotídeos fosfatados (2mM) (dNTPs, Invitrogen, São Paulo, São Paulo,

Brasil); 6 µL de solução de cloreto de magnésio (25 mM) (MgCl₂, Invitrogen, São Paulo, São Paulo, Brasil); 1,25 µL de uma solução 100 µM de Primer Forward (20 mM) (Invitrogen, São Paulo, São Paulo, Brasil); 1,25 µL de uma solução 100 µM de Primer Reverse (20 mM) (Invitrogen, São Paulo, São Paulo, Brasil); 29,3 µL de água ultrapura livre de DNAase e RNAase; 0,25 µL da enzima Taq DNA Polimerase (Taq Platinum, Invitrogen, São Paulo, São Paulo, Brasil) e 2 µL de DNA extraído da amostra coletada do canal radicular.

O Nested PCR consiste em duas etapas. As etapas iniciais (FILE 11) do ciclo de PCR compreenderão uma desnaturação inicial (95°C, 2 min); 22 ciclos de desnaturação (94°C, 1 min), anelamento (42°C, 2min) e extensão (72°C, 3 min); seguidos de uma extensão final (72°C, 10 minutos). Produtos da reação da PCR foram analisados pelo gel eletroforético de agarose 1% (Invitrogen® - Life Technology do Brasil) em tampão de Tris-borato EDTA (pH 8,0) (TBE) corado com brometo de etídio (5µg/mL-Invitrogen®, São Paulo, SP, Brasil) (Figura 2). Foi incluído em cada gel, um padrão de peso molecular de 100 bp (DNA ladder, Invitrogen® - Life Technology do Brasil). Após o término de cada corrida (60 volts por 40 min), as bandas foram observadas com transiluminador de luz ultravioleta. A identificação positiva ou negativa foi baseada na presença de bandas limpas do esperado tamanho da molécula na altura do fragmento.

Verificado o sucesso da reação universal, uma alíquota do produto desta reação foi utilizada para realização de outra reação PCR, agora usando um primer espécie-específico juntamente com o L189R. As espécies investigadas foram: *A. actinomycetemcomitans*, *A. naeslundii*, *D. pneumosintes*, *E. faecalis*, *F. alocis*, *F. nucleatum*, *G. morbillorum*, *P. micra*, *P. endodontalis*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *P. tanneriae*, *S. sobrinus*, *T. forsythia*, *T. denticola* e *T. socranskii* (Quadro 1).

Quadro 1. Sequências dos primers espécie-específico que foram utilizados nas reações de PCR.

Primer / Especificidade	Sequência	Ciclo
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> (16S)	GAAGAAGAACTCAGAGATGGGTTT	File 12
<i>Actinomyces naeslundii</i> (16S)	TGGAGACGGGGTTTCCTCCTTTG G	File 12
<i>Dialister pneumosintes</i> (16S)	CCTTGACATTGATCGCAATCCATA GAAATAT	File 12
<i>Enterococcus faecalis</i> (16S)	GTCGCTAGACCGCGAGGTCATGC A	File 12
<i>Filifactor alocis</i> (16S)	ACATAACCAATGACAGCCTTTTTA A	File 12
<i>Fusobacterium nucleatum</i> (16S)	TTCGGGGAAACCTAAAGACAGGT GG	File 12
<i>Gemella morbillorum</i> (16S)	CGAGAGTCAGCCAACCTCATA	File 12
<i>Parvimonas micra</i> (16S)	AACGAGAAGCGAGATAGAGATGTT A	File 12
<i>Porphyromonas endodontalis</i> (16S)	TTTAGATGATGGCAGATGAGAG	File 12
<i>Porphyromonas gingivalis</i> (16S)	CATCGGTAGTTGCTAACAGTTTTTC	File 12
<i>Prevotella intermedia</i> (16S)	TGTTAGCGCCTTGCGCTA	File 12
<i>Prevotella nigrescens</i> (16S)	CGTTGGCCCTGCCTGCGG	File 12
<i>Prevotella tanneriae</i> (16S)	CCAAGAGTGCGGAGTGCAAGAT GCGC	File 12
<i>Streptococcus sobrinus</i> (16S)	TTTTTCTTCGGAACATCGGAG	File 12

Quadro 1. Sequências dos primers espécie-específico que foram utilizados nas reações de PCR (continuação).

Primer / Especificidade	Sequência	Ciclo
<i>Tannerella forsythia</i> (16S)	TGCGATATAGTGTAAGCTCTACAG	File 12
<i>Treponema denticola</i> (16S)	CAACAGCAATGAGATATGG	File 12
<i>Treponema socranskii</i> (16S)	ATGTACACTGGGCGTGTGCG	File 12
785F / Universal (16S)	GGATTAGATACCCTGGTAGTC	File 11
422R / Universal (23S)	GGAGTATTTAGCTT	File 11
L189R / Universal (23S)	GGTACTTAGATGTTTCAGTTC	File 12

As etapas finais (FILE 12) do ciclo de PCR compreenderam 27 ciclos de desnaturação (94°C, 1 min), anelamento (52°C, 2min) e extensão (72°C, 3 min). Para essa etapa final foram utilizados os reagentes nas mesmas concentrações da primeira reação FILE 11 e os produtos analisados pelo gel eletroforético de agarose 1%.

A figura 1 mostra materiais utilizados na reação de Nested PCR para a identificação microbiana nas amostras das bolsas periodontais e canais radiculares.



Figura 1. Reação de Nested PCR. **A-** Termociclador. **B-** Transiluminador de luz ultravioleta. **C-** Gel de agarose 1% com presença das bandas.

4.4.2. Identificação microbiana pelo método molecular - *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*

A metodologia empregada para a Técnica de *Checkerboard DNA-DNA hybridization* seguiu a descrição feita por Socransky et al. (1994).

Extração do DNA microbiano

Tubos tipo Eppendorf com 250 μ L das amostras contendo cones de papel e bolinhas de vidro foram agitados no Vortex (Agitador de Tubos). Após esse procedimento, os tubos foram centrifugados a 12.000 RPM por 5 minutos. O sobrenadante neles contido foi então descartado e o pellet ressuspenso com 150 μ L de solução TE e 100 μ L de solução de hidróxido de sódio (NaOH). As suspensões contendo as amostras coletadas foram aquecidas em banho-maria por dez minutos e em seguida neutralizadas pela adição de 0,8 mL de 5M de acetato de amônia

(C₂H₇NO₂). Com isto, as células bacterianas foram lisadas e o DNA ficaram suspenso na solução.

Fixação das amostras na membrana de Nylon

Uma membrana de nylon (15 x15cm) com carga positiva (Amersham Biosciences, Chicago, IL, EUA) foi montada no Minislot 30® (Immunitics, Cambridge, MA, EUA). Cada suspensão de amostra contendo DNA livre foi depositada nas fendas do Minislot 30® e o DNA concentrado permaneceu depositado na membrana de nylon. A membrana foi removida do aparato e o DNA, previamente depositado na mesma, fixado por intermédio de aquecimento em forno a 120°C, por 20 minutos. As duas últimas canaletas do Minislot 30® foram reservadas para a colocação dos controles, contendo uma mistura das espécies dos micro-organismos que serão investigados pelas sondas de DNA, em duas concentrações, 10⁵ e 10⁶ células bacterianas.

Hibridização da membrana com as sondas de DNA

Após a fixação do DNA na membrana, esta foi pré-hibridizada a 42°C, por uma hora, numa solução de 50% formamida, 1% caseína, 5 X SSC (Solução Salina Citratada), 25 mM de fosfato de sódio (pH 6,5) e 0,5 mg/mL de RNA de levedura. A membrana foi então colocada sob a placa acrílica do Miniblotter 45® (Immunitics, Cambridge, MA, EUA), rotacionada a 90° de sua posição original, com as linhas contendo o DNA fixado, perpendiculares às canaletas do Miniblotter 45®. O Miniblotter 45® contém 45 canaletas que servem, cada uma, para a colocação de uma sonda de DNA.

As sondas de DNA específicas para as espécies usadas nesse estudo (Quadro 2) foram confeccionadas usando o *random primer digoxigenin labeling Kit* (Boehringer Mannheim, Indianápolis, IN, EUA), como descrito por Feinberg & Vogelstein (1983). Essas espécies foram selecionadas devido à sua associação às infecções endodônticas ou a sua presença em outras infecções orais e saliva (Gomes et al., 1994a; Siqueira Jr. & Rôças, 2003; Gomes et al., 2004; Gomes et al., 2005).

Quadro 02. Relação completa das cepas empregadas para o desenvolvimento das sondas de DNA bacteriano.

Sondas	ATCC
01. <i>Actinomyces israelii</i>	12102
02. <i>Actinomyces odontolyticus</i>	17929
03. <i>Actinomyces oris</i>	43146
04. <i>A. actinomycetencomytans</i> (a+b)	43718 + 29523
05. <i>Campylobacter gracilis</i>	33238
06. <i>Campylobacter rectus</i>	33238
07. <i>Campylobacter showae</i>	51146
08. <i>Capnocytophaga gingivalis</i>	33624
09. <i>Capnocytophaga ochracea</i>	33596
10. <i>Capnocytophaga sputigena</i>	33612
11. <i>Dialister pneumonsintes</i>	G8427
12. <i>Eikenella corrodens</i>	23834
13. <i>Enterococcus faecalis</i>	29212
14. <i>Enterococcus faecium</i>	6569
15. <i>Enterococcus hirae</i>	10541
16. <i>Eubacterium nodatum</i>	33099
17. <i>Eubacterium saburreum</i>	33271
18. <i>Fusobacterium nucleatum</i> sp. <i>nucleatum</i>	25586
19. <i>Fusobacterium nucleatum</i> sp. <i>polymorphum</i>	10953
20. <i>Fusobacterium nucleatum</i> sp. <i>vincentii</i>	49256
21. <i>Fusobacterium periodontium</i>	33693
22. <i>Gemella morbillorum</i>	27824
23. <i>Leptotrichia buccalis</i>	14201
24. <i>Neisseria mucosa</i>	19696
25. <i>Parvimonas micra</i>	33270
26. <i>Porphyromonas endodontalis</i>	35406
27. <i>Porphyromonas gingivalis</i>	33277
28. <i>Prevotella intermedia</i>	25611

Quadro 02. Relação completa das cepas empregadas para o desenvolvimento das sondas de DNA bacteriano (continuação).

Sondas	ATCC
28. <i>Prevotella intermedia</i>	25611
29. <i>Prevotella melaninogenica</i>	25845
30. <i>Prevotella nigrescens</i>	33563
31. <i>Propionibacterium acnes</i> (I+II)	11827 + 11828
32. <i>Selenomonas noxia</i>	43541
33. <i>Streptococcus gordonii</i>	10558
34. <i>Streptococcus intermedius</i>	27335
35. <i>Streptococcus mitis</i>	49456
36. <i>Streptococcus oralis</i>	35037
37. <i>Tannerella forsythia</i>	43037
38. <i>Treponema denticola</i> B1	Forsyth
39. <i>Treponema socranskii</i> S1	Forsyth
40. <i>Veillonella párvula</i>	10790

Anteriormente ao seu uso, as sondas foram testadas com uma mistura controle contendo as espécies investigadas, numa concentração de 10^4 células bacterianas. Suas concentrações foram ajustadas de tal modo que a intensidade dos sinais de todas as sondas fosse semelhante.

Cada sonda de DNA contida numa solução de hibridização (45% formamida, 5 X SSC, 20 mM de fosfato de sódio (pH 6,5), 0,2 mg/mL de RNA de levedura, 10% de sulfato de dextrano, 1% caseína e 20 mg/mL de sonda de DNA) foi removida com pipeta e colocada em canaleta do Miniblotter 45®. De modo que cada canaleta do Miniblotter 45® fosse preenchida com 135 µL de uma determinada sonda. As sondas hibridizaram perpendicularmente às linhas contendo o DNA bacteriano fixado, propiciando um formato de xadrez com as linhas de DNA, horizontais, e as sondas, verticais. O aparato, contendo o Miniblotter 45® e a membrana com as sondas e o DNA das amostras bacterianas fixado, foram colocadas dentro de um saco plástico

umedecido para evitar a desidratação das mesmas e incubado a 42°C para que a hibridização ocorra. A hibridização das membranas com as sondas ocorreu durante um período mínimo de 12 horas (*overnight*).

Detecção das espécies

Após a hibridização com as sondas, as membranas foram removidas do Miniblotter 45® e lavadas por 40 minutos a 65°C, numa solução adstringente de PO₄ Buffer (tampão de fosfato), a fim de remover sondas que não hibridizaram completamente. Em seguida, as membranas foram imersas por 1 hora, sob agitação, numa solução bloqueadora contendo 0,1 M ácido maleico, 3 M NaCl, 0,2 M NaOH, 0,3% Tween 20, 0,5% caseína, pH 8,0 e por 30 minutos na mesma solução contendo o anticorpo anti-digoxigenina (Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments-Roche Diagnostics GmbH, Mannheim-Germany) conjugado à fosfatase alcalina numa diluição de 1/25.0008. As membranas foram, então, lavadas com uma solução de 0,1 M ácido maleico, 3 M NaCl, 0,2 M NaOH, 0,3% Tween 20, pH 8,0, duas vezes por 20 minutos, e uma vez por 5 minutos em 0,1 M Tris HCl, 0,1 NaCl, 50 mM MgCl₂, pH 9,5. Em seguida, as membranas foram incubadas em uma solução detectora, CDP-Star Detection Reagent® (Amersham Biosciences UK Limited, Buckinghamshire - UK), por 60 minutos a 37°C. Finalmente, as membranas foram colocadas num cassete sob um filme radiográfico (Kodak® X-OMAT Kodak Brasileira Com. e Ind. Ltda, São José dos Campos, SP) por aproximadamente 40 minutos, e os filmes revelados logo em seguida. Cada sinal produzido por uma determinada sonda na amostra dos canais radiculares foi comparado em intensidade ao sinal produzido pela mesma sonda nos dois controles 10⁵ e 10⁶. Assim sendo, o número (0) foi registrado quando não houver detecção de sinal (1) quando houve um sinal menos intenso que o controle de 10⁵ células; (2) a aproximadamente 10⁵ células; (3) entre 10⁵ e 10⁶ células; e (4) aproximadamente 10⁶ células. Esses registros foram utilizados para determinar os diferentes níveis das espécies investigadas em cada amostra.

4.4.3. Quantificação de endotoxinas (LPS)

Teste Limulus Amebocyte Lysate (LAL) Pyrogen-5000 (Lonza, Walkersville, MD, EUA)

Para a realização do teste LAL Pyrogen-5000 (Figura 2), todos os materiais foram apirogênizados [calor seco (estufa) a 250°C por 30 minutos ou por energia ionizante (EMBRARAD, Cotia, SP)]. Outros materiais já se apresentavam apirogênicos e esterilizados oriundos de fábrica (Lonza, Walkersville, MD, EUA).

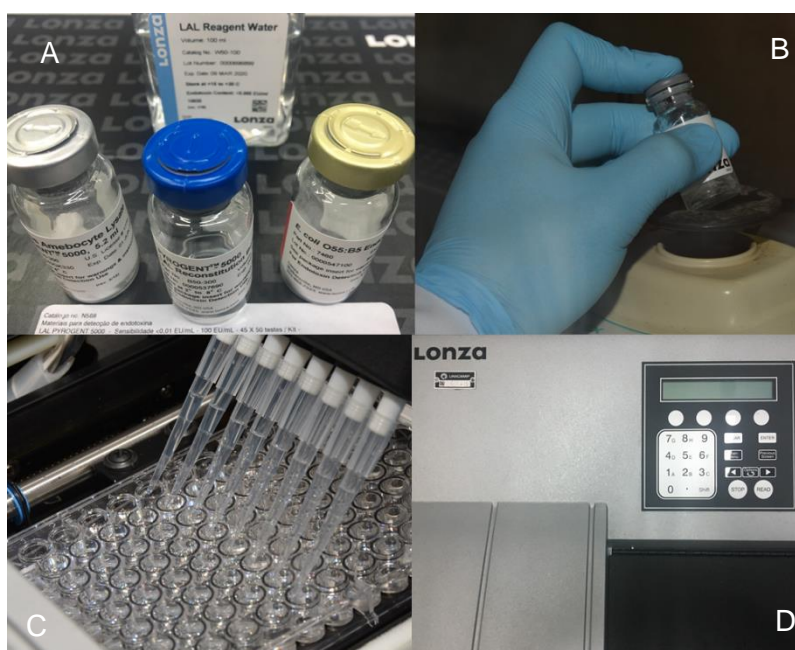


Figura 2. Processamento de endotoxinas pelo ensaio LaL Pyrogen 5000. **A-** Reagentes do Kit. **B-** Vórtex. **C-** Colocação dos reagentes na placa de 96 poços. **D-** Leitor de microplacas.

Pyrogen-5000 é um ensaio cinético quantitativo para detecção de endotoxina de bactéria Gram-negativa. Esse teste utiliza uma preparação de Lisado do Amebócito Limulus (LAL), em combinação com um incubador fotométrico e um software apropriado, para detecção fotométrica da endotoxina. Uma amostra é misturada com o reagente LAL reconstituído, colocada em um fotômetro e monitorada automaticamente até o desenvolvimento de uma aparência de turvação (densidade ótica). O tempo necessário antes da aparição da turvação (tempo de reação) é

inversamente proporcional a quantidade de endotoxina presente. A concentração de endotoxina em amostras desconhecidas pode ser calculada a partir de uma curva-padrão.

Para o cálculo da concentração de endotoxina em amostras desconhecidas foi estabelecida uma curva-padrão com quantidades conhecidas de endotoxina (*Escherichia coli*). Esta foi preparada utilizando soluções com concentrações 0,01 EU/mL, 0,10 EU/mL, 1 EU/mL, 10 EU/mL, 100 EU/mL (Tabela 1).

Tabela 1. Diluição da solução de endotoxina de *E. coli* para determinação da curva padrão.

Tubos apirogênicos	Concentração de endotoxina (EU/mL)	Volume de água reagente LAL (ml)	Volume de solução de endotoxina adicionado à água apirogênica
1	10	0,9	0,1 mL de 100 EU/mL solução
2	1	0,9	0,1 mL de 10 EU/mL solução
3	0,10	0,9	0,1 mL de 1 EU/mL solução
4	0,01	0,9	0,1 mL de 0,10 EU/mL solução

Os valores da absorbância das soluções de endotoxina previamente preparadas foram espectrofotometricamente medidos a 340 nm no leitor Biotek (ELX 808, Winooski, VT, EUA). A absorbância a 340 nm deve ser linear com os intervalos de concentração usados. A linearidade da curva padrão dentro do intervalo de concentração foi usada para determinar os valores de endotoxina. A reprodutibilidade pode ser verificada pela comparação das diferentes curvas.

Procedimentos para execução do teste

Foi impresso um esboço com o posicionamento da água apirogênica, da curva padrão, das amostras e do controle positivo do produto (PPC) na microplaca de 96 poços (Corning Costar Corporation, Cambridge, MA, EUA). Em seguida, foi dispensado cuidadosamente no interior dos poços da microplaca: 100 µl das amostras e 100 µl dos controles positivos das mesmas, ambas em duplicata. Nas amostras controles foram dispensados 10 µl da endotoxina na concentração de 10 EU/mL, evitando formação de bolha. Após o preenchimento das amostras e dos respectivos controles previamente contaminados com *E. coli*, foi dispensado cuidadosamente no interior dos poços da microplaca: 100 µl de água apirogênica (branco), padrões de endotoxina (100 µl da concentração de 0,01 EU/mL; 0,1 EU/mL; 1 EU/mL; 10 EU/mL e 100 EU/mL). A placa foi pré-incubada por ≥ 10 minutos a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, no leitor Biotek. Próximo ao final do período de pré-incubação, cada frasco de reagente Pyrogent-5000 foi reconstituído com 5,2 mL de tampão de reconstituição Pyrogent- 5000. Após isso, foi dispensado rapidamente 100 µL do reagente reconstituído de Pyrogent- 5000 dentro de todos os poços da microplaca, iniciando pela primeira coluna (A1-H1) e procedendo em sequência até a última coluna utilizada. Com a tampa da microplaca removida foi iniciada a leitura.

Cálculo da concentração de endotoxinas

De forma contínua durante todo o ensaio, o leitor de microplacas foi monitorado na absorvância de 340 nm de cada poço da microplaca. Usando a leitura de absorvância inicial de cada orifício como seu próprio branco, o leitor determina o tempo necessário para que a absorvância aumente a 0,03 unidades. Este tempo é denominado tempo de reação. O software WinKQCL (Lonza, Walkersville, MD, EUA) executa automaticamente uma correlação linear log/log do tempo de reação de cada padrão com a concentração de endotoxina correspondente. Os parâmetros da curva padrão foram impressos no relatório. Se o valor absoluto do coeficiente de correlação (r) for $\geq 0,980$, um modelo polinomial pode ser usado para construir uma curva padrão e, assim, predizer as concentrações de endotoxina das amostras.

4.4.4. Quantificação de ácido lipoteicoico (LTA)

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Os níveis de LTA nas diferentes fases do tratamento endodôntico foram medidos utilizando o *Human lipoteichoic acids (LTA) ELISA Kit* (My BioSource, San Diego, CA, EUA) (Figura 3). Os procedimentos para a quantificação do LTA foram os seguintes:



Figura 3. Ácido lipoteicoico (ELISA Kit). **A-** Kit do LTA. **B-** Reagentes utilizados na reação. **C-** Colocação de reagentes. **D-** Aspecto final da placa de 96 poços após o experimento.

1. Inicialmente 100µL das soluções da curva padrão, controle e as amostra foram adicionadas a placa de ELISA, já pré-revestida com o anticorpo monoclonal específico para LTA fornecido pelo fabricante e a placa foi incubada a 37°C por 90 minutos.

2. Após uma lavagem da placa, os anticorpos anti-LTA marcados com biotina foram adicionados para que ocorresse a união com a estreptavidina-HRP, formando um complexo imune. A placa foi incubada durante 60 minutos a 37 °C e depois lavada três vezes para remoção de enzimas não ligadas.

3. Uma solução de reação enzimática foi adicionada e a placa incubada a 37°C por 30 minutos, permitindo a reação.

4. Após um novo ciclo de cinco lavagens, uma solução de reagentes colorimétricos foi adicionada, e outro período de incubação de 37°C por 30 minutos foi realizado.

5. O último reagente colorimétrico C, foi adicionado e a placa lida em um leitor de Elisa após uma pausa de 10 minutos. Os tons da solução presentes nos poços e a concentração de LTA foram diretamente proporcionais. Os níveis de LTA foram avaliados por um leitor de ELISA a 450 nm e normalizado para valores de controle negativos. Cada valor densitométrico, expresso como média e desvio padrão, foi obtido a partir de dois experimentos independentes.

4.5. Análise estatística

Os dados coletados foram tabulados e analisados utilizando o programa SPSS for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA). A normalidade dos dados foi verificada por meio de teste de Shapiro Wilk. Na ausência de normalidade foram aplicados testes não paramétricos para análise dos dados. Os dados referentes ao Nested PCR foram avaliados através do teste de Friedman. Os dados do *Checkerboard DNA-DNA hybridization* foram analisados pelo teste de Wilcoxon. A comparação entre o Nested PCR e o *Checkerboard DNA-DNA hybridization* foi feita pelo teste de McNemar. As comparações dos níveis de endotoxinas e ácido lipoteicóico nas diferentes etapas do tratamento endodôntico foram analisadas através do teste de Wilcoxon e entre os diferentes sítios através do teste de Mann-Whitney. O nível de significância foi de 5%.

5 RESULTADOS

5.1. Aspectos clínicos

5.1.1. Caracterização da amostra em relação aos aspectos clínicos dos pacientes com lesão periodontal primária com envolvimento endodôntico secundário

No total, 10 pacientes com faixa etária entre 15 e 53 anos (média: 31 anos) participaram voluntariamente deste estudo. Destes, 40% (4/10) eram do sexo masculino e 60% (6/10) do sexo feminino.

Em relação aos elementos dentais 6 dentes eram unirradiculares e 4 multirradiculares. Os dentes incluídos no estudo foram incisivos superiores (6/10), pré-molares superiores (2/10), molar superior (1/10) e molar inferior (1/10).

Em relação à condição da coroa clínica dos elementos dentais envolvidos, todos estavam híginas (10/10).

Em relação à condição pulpar, após a realização do teste de sensibilidade pulpar à frio, todos os dentes (10/10) apresentaram resposta pulpar anormal. Não foram incluídos no estudo dentes com necrose pulpar. Nenhum paciente relatou dor espontânea, dor à percussão (vertical e horizontal) ou dor à palpação no momento da realização do tratamento endodôntico.

Em relação à condição periodontal, todos os dentes (10/10) apresentaram bolsas periodontais maiores que 6 mm, com média de 9 ($\pm 1,6$) mm. A menor bolsa periodontal detectada foi de 7 mm, enquanto que a maior bolsa periodontal registrada foi de 12 mm. Nível de inserção clínica médio, que compreende a soma da recessão gengival e da profundidade de sondagem, apresentado foi de 10,2 ($\pm 1,98$). Oito entre 10 dentes apresentaram mobilidade grau 1, e 2 entre 10 dentes mobilidade grau 2. Não foi registrado dentes com mobilidade grau 3 neste estudo. A tabela 2 mostra a caracterização da amostra em relação aos aspectos clínicos dos pacientes que participaram da pesquisa.

Tabela 2. Caracterização da amostra em relação aos aspectos clínicos dos pacientes com lesão periodontal primária com envolvimento endodôntico secundário (n = 10).

Parâmetros	Dados amostrais
Idade (anos)	31 (\pm 16)
Sexo (masculino / feminino)	4 / 6
Uni -/ multi-radiculares	6 / 4
Aspecto da coroa clínica (hígida)	10
Sensibilidade pulpar (positivo / negativo)	10 / 0
Dor à percussão vertical (presente / ausente)	0 / 10
Dor à percussão horizontal (presente / ausente)	0 / 10
Dor à palpação (presente / ausente)	0 / 10
Profundidade de sondagem (mm)	9 (\pm 1,69)
Nível de inserção clínica (mm)	10,2 (\pm 1,98)
Mobilidade (grau 1 / 2 / 3)	8 / 2 / 0

5.2. Identificação microbiana através do método molecular - Nested PCR

5.2.1. Efeito do preparo químico-mecânico na microbiota das bolsas periodontais através do método molecular Nested PCR

Foi detectado DNA bacteriano em todas as amostras das bolsas periodontais em dentes com lesão periodontal primária com envolvimento endodôntico secundário (10/10).

Nas amostras iniciais, realizadas antes do preparo químico-mecânico (C1), *Enterococcus faecalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas endodontalis*,

Porphyromonas gingivalis, *Prevotella nicrescens* e *Tanarella forsythia* foram as bactérias mais prevalentes, sendo detectadas em 100% dos casos (10/10). *Actinomyces naeslundii*, *Filifactor alocis*, *Gemella morbillorum* e *Prevotella intermedia* foram detectadas em 90% das amostras (9/10). *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Dialister pneumosintes*, *Parvimonas micra* e *Treponema denticola* estavam presentes em 80% (8/10) das amostras. *Prevotella tanneriae* (6/10), *Treponema socransky* (5/10) e *Streptococcus sobrinus* (4/10) foram detectados em menores níveis nas coletas iniciais de bolsas periodontais.

As coletas realizadas nas bolsas periodontais após o preparo químico-mecânico (C2) revelaram que não houve diminuição da prevalência de *Enterococcus faecalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Parvimonas micra*, *Porphyromonas gingivalis*, *Streptococcus sobrinus*, *Tanarella forsythia* e *Treponema socransky*, evidenciando a alta capacidade de resistência destas bactérias aos procedimentos mecânicos e químicos empregados durante a terapia endodôntica.

Houve uma redução da prevalência de bactérias após o preparo químico-mecânico nas bolsas periodontais das *Actinomyces naeslundii*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Dialister pneumosintes*, *Filifactor alocis*, *Gemella morbillorum*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nicrescens*, *Prevotella tanneriae*, e *Treponema denticola* ($P > 0.05$).

5.2.2. Efeito da medicação intracanal à base de hidróxido de cálcio na microbiota das bolsas periodontais através do método molecular Nested PCR

Trinta dias após o uso de uma medicação intracanal à base de hidróxido de cálcio, houve redução microbiana em algumas espécies. A bactéria mais sensível à medicação intracanal foi a *Tanarella forsythia*. Entretanto também foi observada redução de *Actinomyces naeslundii*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Dialister pneumosintes*, *Gemella morbillorum*, *Parvimonas micra*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nicrescens*, *Streptococcus sobrinus*, *Treponema denticola*.

A comparação entre a coleta realizada após o preparo químico-mecânico e após a medicação intracanal, revelou um aumento de algumas espécies microbianas, como *Dialister pneumosintes*, *Filifactor alocis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella tanneriae* e *Treponema denticola*.

5.2.3. Efeito do preparo químico-mecânico na microbiota dos canais radiculares através do método molecular Nested PCR

Foi detectado DNA bacteriano nas amostras dos canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária com envolvimento endodôntico secundário (10/10). Do total de 17 *primers* utilizados na reação do Nested PCR, apenas 11 foram reativos para estas amostras.

Nas amostras iniciais (C1), as bactérias mais prevalentes foram *Enterococcus faecalis* (10/10), *Fusobacterium nucleatum* (10/10), *Porphyromonas gingivalis* (8/10) e *Prevotella tanneriae* (8/10). *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (3/10), *Filifactor alocis* (3/10), *Tanarella forsythia* (3/10), *Actinomyces naeslundii* (2/10), *Porphyromonas endodontalis* (2/10) e *Streptococcus sobrinus* (1/10) também foram detectados, todavia, em menores proporções. *Dialister pneumosintes*, *Gemella morbillorum*, *Parvimonas micra*, *Prevotella intermedia*, *Treponema denticola* e *Treponema socransky* não foram detectados nos canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária com envolvimento endodôntico secundário.

Algumas espécies bacterianas como *Enterococcus faecalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella tanneriae* apresentaram grande resistência aos procedimentos endodônticos. Por outro lado, preparo químico-mecânico mostrou-se eficaz na eliminação de DNA bacteriano das espécies *Actinomyces naeslundii*, *Filifactor alocis*, *Streptococcus sobrinus* e *Tanarella forsythia*.

5.2.4. Efeito da medicação intracanal à base de hidróxido de cálcio na microbiota dos canais radiculares através do método molecular Nested PCR

Em relação à coleta inicial, a medicação intracanal foi eficaz contra bactérias resistentes como *Enterococcus faecalis* e *Prevotella Tanneriae*, apresentando diferenças estatísticas significativas. Nenhum efeito adicional foi observado diante de *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella nigrescens*, evidenciando grande resistência destas espécies microbianas mesmo após 30 dias de medicação intracanal.

Após a medicação intracanal, houve maior detecção de *Porphyromonas*

endodontalis comparado ao período pós preparo químico-mecânico.

O DNA bacteriano das espécies *Filifactor alocis* e *Tanerella forsythia* que foi detectado nas coletas iniciais, mas que não foi detectado após o preparo químico-mecânico, voltou a ser encontrado pós-medicação intracanal.

A prevalência das 17 bactérias encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares, nas diferentes etapas do tratamento endodôntico, dos pacientes que participaram desse estudo por meio do Nested PCR está descrita na figura 4.

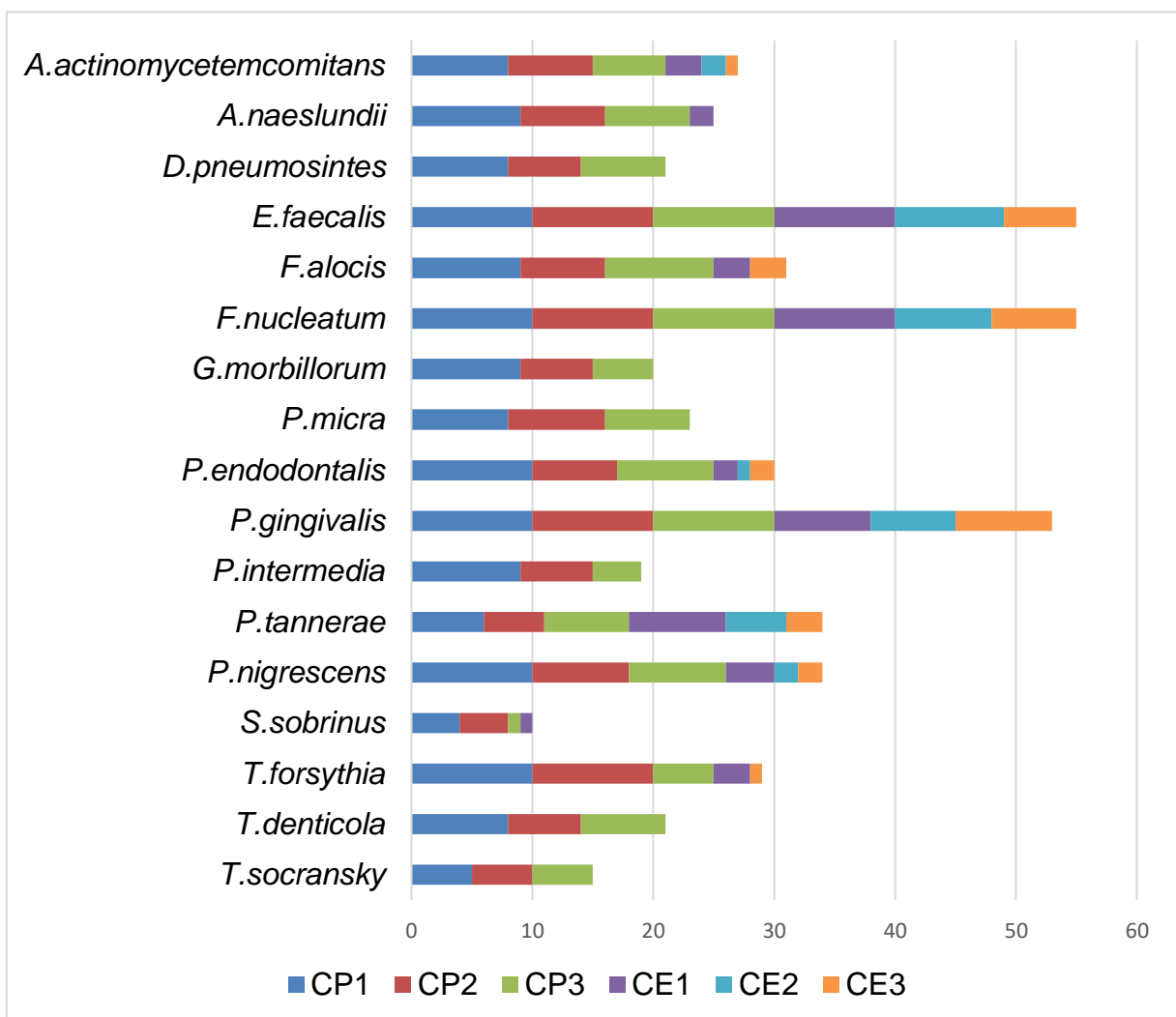


Figura 4. Prevalência das 17 bactérias encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares nas diferentes etapas do tratamento endodôntico de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário (n = 10).

O estudo da microbiota por meio do Nested PCR revelou uma elevada prevalência de bactérias Gram-negativas investigadas (94) comparadas às Gram-positivas investigadas (49) nas coletas iniciais nas bolsas periodontais. Após o preparo químico-mecânico e após a medicação intracanal, foi observada uma redução dos micro-organismos neste sítio, entretanto, sem diferenças estatísticas.

Em relação aos canais radiculares, também foi observado maior prevalência de bactérias Gram-negativas, entretanto, após o tratamento endodôntico foi houve redução significativa tanto das bactérias Gram-positivas quanto das bactérias Gram-negativas (Tabela 3).

Tabela 3. Prevalência de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas investigadas nos canais radiculares e bolsas periodontais nas diferentes etapas do tratamento endodôntico em dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário.

Bactérias	CP1	CP2	CP3	CE1	CE2	CE3
GP	49 ^A	42 ^A	39 ^A	16 ^B	9 ^A	9 ^A
GN	94 ^A	80 ^A	77 ^A	38 ^B	25 ^A	24 ^A

GP: Gram-positivo; GN: Gram-negativo; CP1: coleta periodontal inicial; CP2: coleta periodontal após o preparo químico-mecânico; CP3: coleta periodontal após a medicação intracanal; CE1: coleta endodôntica inicial; CE2: coleta endodôntica após o preparo químico-mecânico; CE3: coleta endodôntica após a medicação intracanal

Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas no Teste de Friedman ($p < 0,05$)

5.3. Identificação microbiana através método molecular - *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*

5.3.1. Efeito do preparo químico-mecânico na microbiota das bolsas periodontais através do método molecular *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*

No total, 40 sondas foram utilizadas para a realização do *Checkerboard DNA-DNA hybridization* para a investigação da microbiota de dentes com lesão periodontal primária com envolvimento endodôntico secundário.

Das 40 espécies microbianas pesquisadas, 39 foram detectadas em alguma etapa do tratamento endodôntico nas bolsas periodontais. Neste sítio foram detectadas espécies microbianas Gram-positivas e Gram-negativas, entretanto, houve predomínio de bactérias Gram-negativas.

Dentre as espécies avaliadas pelo *Checkerboard DNA-DNA hybridization* nas coletas microbiológicas das bolsas periodontais, 12 apresentaram carga microbiana maior que 10^5 e menor 10^6 células e uma espécie (*Fusobacterium nucleatum*) apresentou carga aproximadamente igual a 10^6 células.

Nas bolsas periodontais, as espécies mais prevalentes nas coletas iniciais foram *Fusobacterium periodonticum* (7/10), *Capnocytophaga ochracea* (5/10) e *Fusobacterium nucleatum* (5/10).

Após a realização do preparo químico-mecânico, foi observado eliminação de algumas espécies microbianas, dentre elas, *E. hirae*, *E. faecium*, *E. nodatum*, *E. saburreum*, *P. micra*, *A. oris*, *E. faecalis*, *S. epidermidis*, *S. mitis*, *G. morbillorum*, *A. actinomycetengencomytans*, *F. n. sp. vincentii*, *T. socranskii*, *V. parvula*, *D. pneumosintes*, *P. endodontialis*, *T. denticola*, *P. melaninogenica*, *E. corrodens*, *C. sputigena* e *P. intermedia*.

Além disso, houve redução microbianas das espécies *S. oralis*, *A. israelii*, *S. intermedius*, *A. odontolyticus*, *S. gordonii*, *S. mutans*, *C. ochracea*, *F. n. (sp. polymorphum)*, *C. showae*, *F. periodonticum*, *F. nucleatum*, *C. gingivalis* e *T. forsythia* ($p > 0,05$).

Não foi observado redução após o preparo químico-mecânico de *F. alocis*. *P. acnes* e *N. mucosa* foram mais prevalentes após o preparo químico-mecânico quando comparados às amostras iniciais.

5.3.2. Efeito da medicação intracanal à base de hidróxido de cálcio na microbiota das bolsas periodontais através do método molecular *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*

Após a utilização de uma medicação intracanal à base de hidróxido de cálcio por 30 dias, houve eliminação de *E. hirae*, *E. nodatum*, *E. saburreum*, *E. faecalis*, *A. odontolyticus*, *S. epidermidis*, *S. mitis*, *G. morillorum*, *F. n. (sp. vincentii)*, *T. denticola*, *F. n. sp. polymorphum*, *C. showae*, *F. periodonticum*, *N. mucosa*, *F. nucleatum*, *P. melaninogenica* e *E. corrodens*, *C. sputigena* e redução em comparação às amostras iniciais de *A. israelii*, *S. gordonii*, *A. actinomycetencomytans*, *D. pneumosintes*, *C. ochracea*, *T. denticola*, *P. nigrescens*, *F. periodonticum*, *N. mucosa*, *C. gingivalis*, *T. forsythia* e *P. intermedia* ($P > 0,05$)

Foi observado aumento de *E. faecium*, *P. micra*, *A. oris*, *S. oralis*, *S. intermedius*, *P. acnes*, *S. mutans*, *P. gingivalis*, *T. socranskii*, *V. parvula*, *D. pneumosintes*, *P. endodontalis* e *P. intermedia* em relação às coletas realizadas após o preparo químico-mecânico ($P > 0,05$).

As figuras 5 e 6 mostram as espécies Gram-positivas e Gram-negativas detectadas nas bolsas periodontais antes e após o preparo-químico mecânico e após a medicação intracanal.

5.3.3. Efeito do preparo químico-mecânico na microbiota dos canais radiculares através do método molecular *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*

Vinte e cinco espécies microbianas foram detectadas nos canais radiculares em alguma etapa do tratamento endodôntico nos canais radiculares.

Nos canais radiculares, apenas 2 espécies apresentaram carga microbiana entre 10^5 e 10^6 células. Não houve presença de bactérias com carga microbiana maior que 10^6 células. Nos canais radiculares também foram encontradas espécies Gram-positivas e Gram-negativas. A maior carga microbiana foi de bactéria Gram-positiva

(*F. alocis*)

Nas amostras iniciais, as espécies mais prevalentes nos canais radiculares foram *Fusobacterium nucleatum* (8/10), *Enterococcus hirae* (7/10) e *Capnocytophaga ochracea* (5/10).

Após a realização do preparo químico-mecânico, foi observado eliminação de algumas espécies microbianas, dentre elas, *E. hirae*, *E. faecium*, *A. israelii*, *S. intermedius*, *S. gordonii*, *A. actinomycetencomytans* e *T. forsythia*. Além disso, houve redução microbianas das espécies *E. faecalis*, *S. epidermidis*, *C. ochracea* e *F. nucleatum*.

5.3.4. Efeito do preparo químico-mecânico na microbiota dos canais radiculares através do método molecular *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*

Após a utilização de uma medicação intracanal à base de hidróxido de cálcio por 30 dias, foi observada eliminação em relação as amostras iniciais das seguintes espécies: *H. hirae*, *E. faecium*, *E. faecalis*, *S. epidermidis* e *T. forsythia* e redução de *C. ochracea* e *F. nucleatum*,

Foi observado aumento de *E. nodatum*, *E. saburreum*, *A. israelii*, *S. intermedius*, *P. acnes*, *S. mitis*, *F. alocis*, *P. gingivalis*, *A. actinomycetencomytans*, *F. n. (sp. vincentii)*, *C. rectus*, *P. endodontalis*, *P. nigrecens*, *F. n. (sp. polymorphum)* e *N. mucosa*.

As figuras 7 e 8 mostram as espécies Gram-positivas e Gram-negativas detectadas nos canais radiculares antes e após o preparo-químico mecânico e após a medicação intracanal.

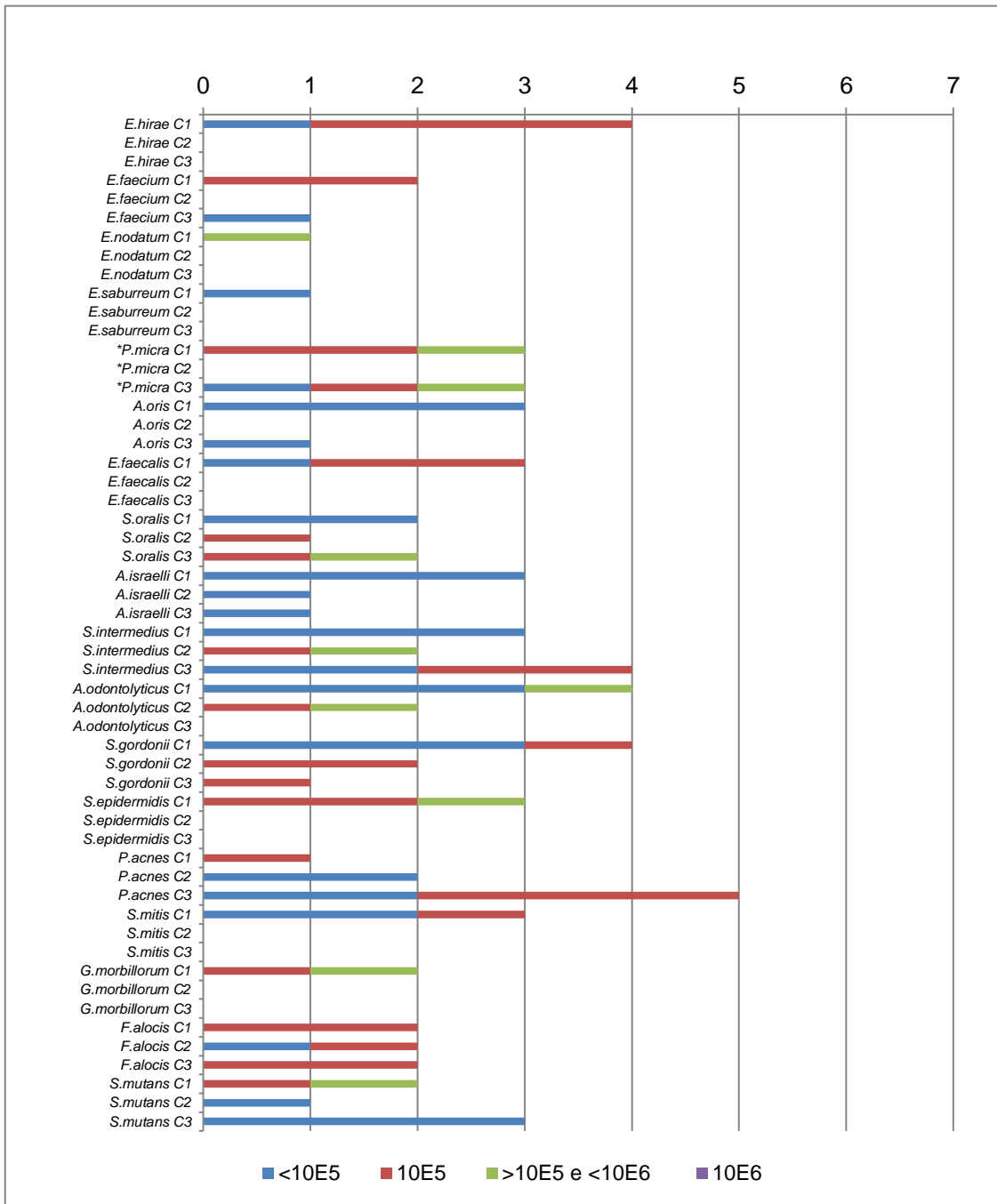


Figura 5. Prevalência e carga microbiana das espécies Gram-positivas detectadas nas bolsas periodontais (n = 10) por meio do *checkerboard DNA-DNA hybridization* de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário. (C1 – coleta periodontal inicial, C2 – coleta periodontal após PQM, C3 – coleta periodontal após MIC).

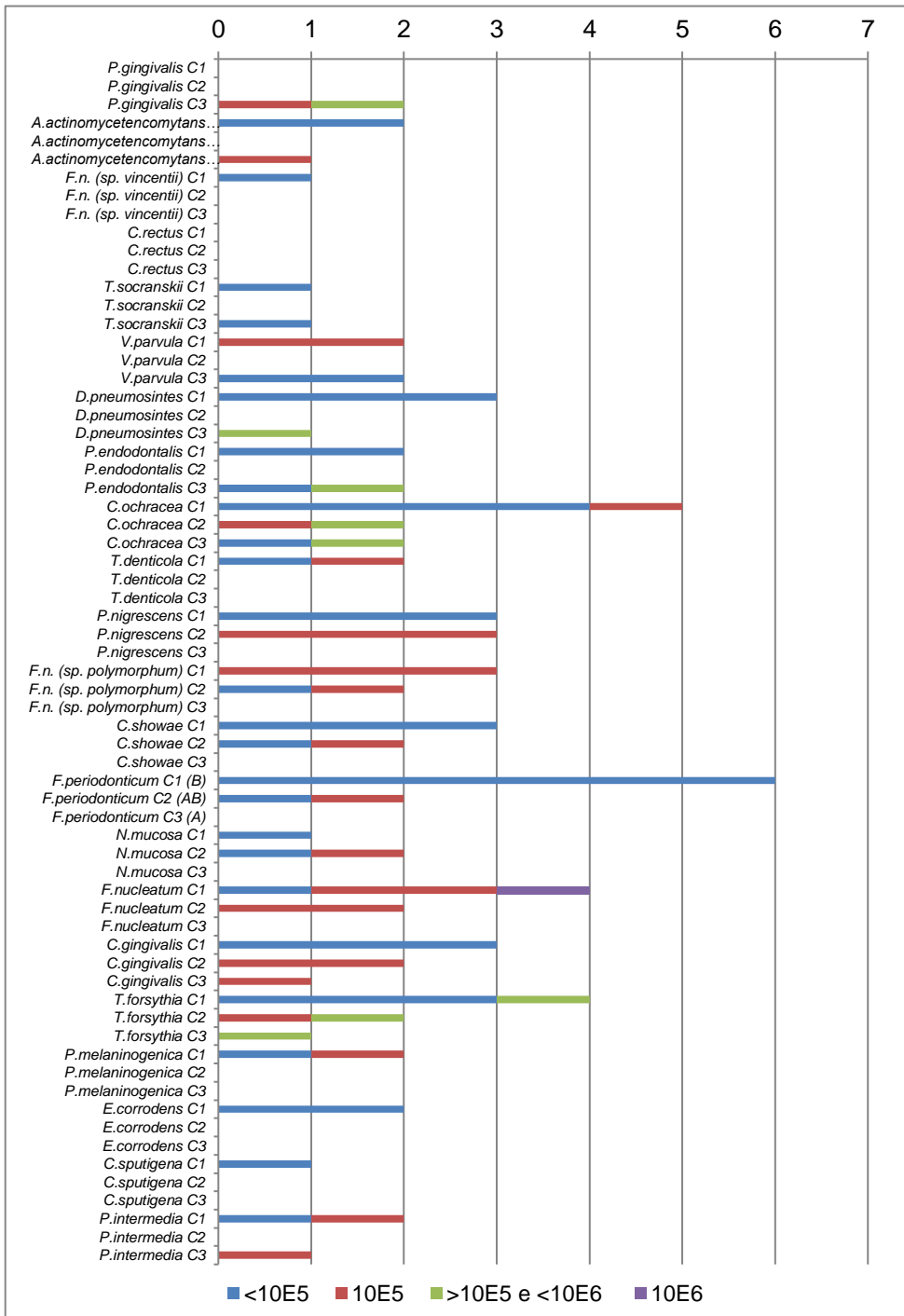


Figura 6. Prevalência e carga microbiana das espécies Gram-negativas detectadas nas bolsas periodontais (n = 10) por meio do *checkerboard DNA-DNA hybridization* de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário. (C1 – coleta periodontal inicial, C2 – coleta periodontal após PQM, C3 – coleta periodontal após MIC).

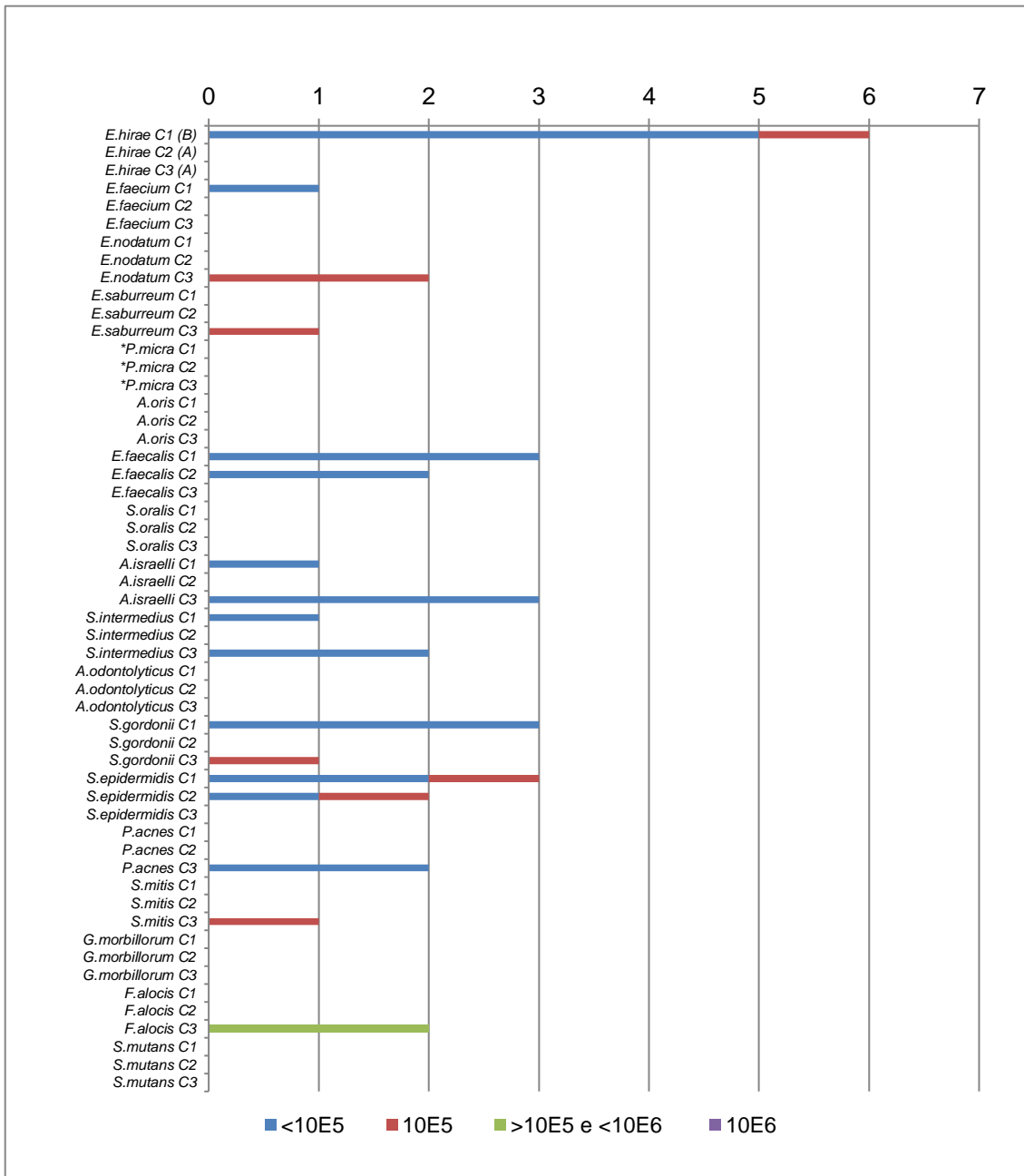


Figura 7. Prevalência e carga microbiana das espécies Gram-positivas detectadas nos canais radiculares (n = 10) por meio do *checkerboard DNA-DNA hybridization* de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário. (C1 – coleta endodôntica inicial, C2 – coleta endodôntica após PQM, C3 – coleta endodôntica após MIC).

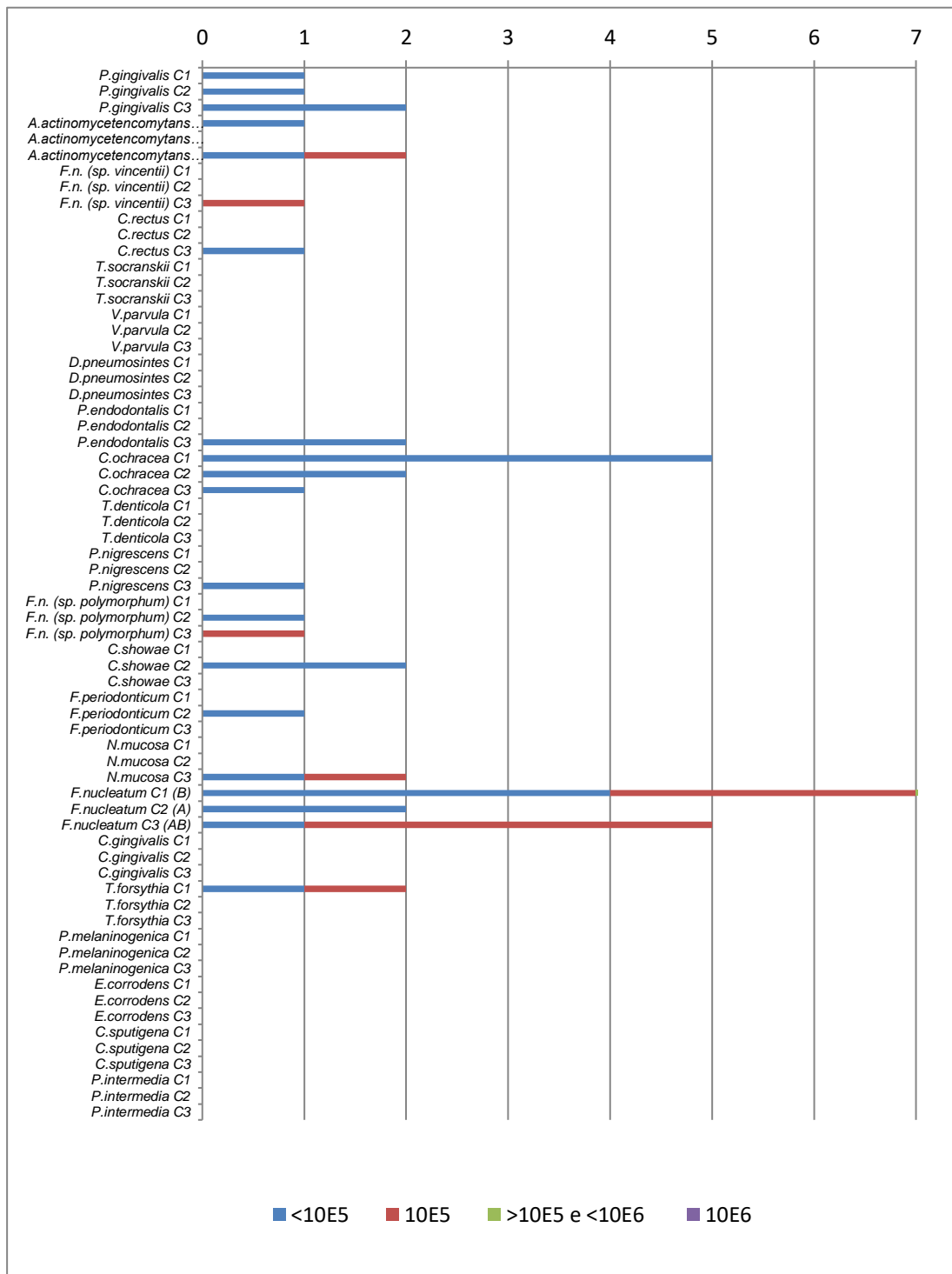


Figura 8. Prevalência e carga microbiana das espécies Gram-negativas detectadas nos canais radiculares (n = 10) por meio do *checkerboard DNA-DNA hybridization* de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário. (C1 – coleta endodôntica inicial, C2 – coleta endodôntica após PQM, C3 – coleta endodôntica após MIC).

5.4. Comparação entre os achados dos métodos moleculares – Nested PCR e *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*

Dos 17 primers utilizados para a realização do Nested PCR e 40 sondas para o *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*, 14 estavam presentes em ambos os métodos.

As bactérias presentes nas duas metodologias empregadas para a caracterização da microbiota dos canais radiculares e bolsas periodontais nas diferentes etapas do tratamento endodôntico de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário foram *A. actinomycetemcomitans*, *D. pneumosintes*, *E. faecalis*, *F. alocis*, *F. nucleatum*, *G. morbillorum*, *P. endodontalis*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *P. micra*, *P. nigrescens*, *T. denticola*, *T. forsythia* e *T. socransky*.

Das 84 análises comparativas entre os métodos (14 bactérias x BP e CR x 3 etapas do tratamento endodôntico – C1, C2 e C3), o Nested PCR se mostrou mais sensível que o *Checkerboard DNA-DNA hybridization* em 62 análises, sendo que 32 apresentaram diferenças estatísticas (tabela 4).

Houve similaridade entre ambas as técnicas em 21 análises.

O *Checkerboard DNA-DNA hybridization* se mostrou mais sensível que o Nested PCR em apenas uma análise (coleta do CR após MIC, bactéria: *A. actinomycetemcomitans*), entretanto, sem diferença estatística.

Tabela 4. Comparação entre as técnicas moleculares do Nested PCR e *Checkerboard DNA-DNA hybridization* na detecção de bactérias (n = 14) encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares antes do preparo químico-mecânico, após o preparo químico-mecânico e após medicação intracanal nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário (n = 10).

Bactéria	Método	BP			CR		
		C1	C2	C3	C1	C2	C3
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	PCR	8	7*	6	3	2	1
	CB	2	0*	1	1	0	2
<i>D. pneumosintes</i>	PCR	8	6*	7*	0	0	0
	CB	3	0*	1*	0	0	0
<i>E. faecalis</i>	PCR	10*	10*	10*	10*	9*	6*
	CB	3*	0*	0*	3*	2*	0*
<i>F. alocis</i>	PCR	9*	7	9*	3	0	3
	CB	2*	2	2*	0	0	2
<i>F. nucleatum</i>	PCR	10*	10*	10*	10	8	7
	CB	4*	2*	0*	8	2	5
<i>G. morbillorum</i>	PCR	9*	6*	5	0	0	0
	CB	2*	0*	0	0	0	0
<i>P. endodontalis</i>	PCR	10*	7*	8*	2	1	2
	CB	2*	0*	2*	0	0	2
<i>P. gingivalis</i>	PCR	10*	10*	10*	8*	7*	8
	CB	0*	0*	2*	1*	1*	2
<i>P. intermedia</i>	PCR	9	6*	4	0	0	0
	CB	3	0*	3	0	0	0
<i>P. micra</i>	PCR	8	8	7*	0	0	0
	CB	3	3	0*	0	0	1
<i>P. nigrescens</i>	PCR	10*	8*	8	4	2	2
	CB	3*	2*	4	1	0	2
<i>T. denticola</i>	PCR	8*	6*	7*	0	0	0
	CB	2*	0*	0*	0	0	0
<i>T. forsythia</i>	PCR	10*	10*	5	3	0	1
	CB	4*	2*	1	2	0	0
<i>T. socransky</i>	PCR	5	5	5	0	0	0
	CB	1	0	1	0	0	0

PCR: Nested PCR; CB: *Checkerboard DNA-DNA hybridization*; BP: bolsa periodontal; CR: canal radicular; C1: coleta inicial; C2: coleta após o preparo químico-mecânico; C3: coleta após 30 dias de medicação intracanal.

*Diferença estatisticamente significativa entre as técnicas de Nested PCR e *Checkerboard DNA-DNA hybridization* pelo teste de McNemar ($p < 0,05$).

5.5. Quantificação de endotoxinas (LPS)

5.5.1. Efeito do preparo químico-mecânico nos níveis de endotoxinas nas bolsas periodontais

Nas coletas realizadas antes do preparo químico-mecânico (C1) foram detectadas a presença de endotoxinas bacterianas em todas as bolsas periodontais de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário (10/10). A mediana encontrada nesta etapa foi de 160,8 EU/mL, sendo que o menor valor encontrado foi de 85,4 UE/mL e o maior valor 363 EU/mL.

Após o preparo químico-mecânico (C2), houve uma redução de 31,59% nos níveis de endotoxinas nas bolsas periodontais. Nesta etapa do tratamento endodôntico foram detectados níveis de endotoxinas iguais a 110,0 (60 – 158,5) UE/mL, com diferença significativa em relação à coleta inicial.

5.5.2. Efeito da medicação intracanal à base de hidróxido de cálcio nos níveis de endotoxinas nas bolsas periodontais

Após a utilização de uma medicação intracanal à base de hidróxido de cálcio por 30 dias (C3), foi possível observar uma redução nos níveis de endotoxinas nas bolsas periodontais de 73,38% quando comparada à coleta inicial, com níveis de 42,8 (16,6 – 164) UE/mL, portanto, houve diferença significativa em relação aos valores iniciais.

Comparando os níveis de endotoxinas após o preparo químico-mecânico (C2) e após a utilização da medicação intracanal por 30 dias, percebe-se que houve uma redução significativa nos níveis de endotoxinas 61,09% [redução de 110,0 (60 – 158,5) EU/mL em C2 para 42,8 (16,6 – 164) EU/mL em C3], evidenciando a necessidade da manutenção da medicação intracanal pelo período de 30 dias para reduzir efetivamente os níveis de endotoxinas nas bolsas periodontais.

5.5.3. Efeito do preparo químico-mecânico nos níveis de endotoxinas nos canais radiculares

Nas coletas iniciais, realizadas antes do preparo químico-mecânico (C1) nos canais radiculares, foram detectados níveis de LPS em todos os casos. Os níveis iniciais de endotoxinas encontrados nos canais radiculares foi de 0,10 (0,1 – 0,1) EU/mL.

Após o preparo químico-mecânico (C2), foi observada uma redução significativa nos níveis de endotoxinas de 80% em relação à coleta inicial [0,02 (0,01 – 0,1) EU/mL], evidenciando a efetividade do preparo químico-mecânico na redução do conteúdo infeccioso em canais radiculares.

5.5.4. Efeito da medicação intracanal à base de hidróxido de cálcio nos níveis de endotoxinas nos canais radiculares

Trinta dias após a utilização de uma medicação intracanal (C3), houve uma redução significativa de 90% [0,01 (0,01 – 0,01) EU/mL] nos níveis de endotoxinas comparados às coletas iniciais.

Analisando os valores de endotoxinas após o preparo químico-mecânico e após a utilização da medicação intracanal, é possível perceber uma redução de 50% nos níveis de endotoxinas nos canais radiculares [redução de 0,02 (0,01 – 0,1) UE/mL em C2 para 0,01 (0,01 – 0,01) UE/mL em C3].

5.5.5. Comparação dos níveis de endotoxinas nas bolsas periodontais e nos canais radiculares nas diferentes etapas do tratamento endodôntico

Os níveis iniciais de endotoxinas nas bolsas periodontais foram significativamente maiores que os encontrados nos canais radiculares [bolsa periodontal: 160,8 (85,4 – 363) EU/mL e canal radicular: 0,1 (0,1 – 0,1) EU/mL].

Em ambos os sítios, houve significativa redução nos níveis de endotoxinas após a realização do preparo químico-mecânico [bolsa periodontal: 110,0 (60,0 – 158,5) EU/mL e canal radicular: 0,02 (0,01 – 0,1) EU/mL], entretanto, os níveis de endotoxinas nas bolsas periodontais permaneceram significativamente maiores

quando comparados aos canais radiculares.

A medicação intracanal foi efetiva no controle do conteúdo infeccioso tanto nas bolsas periodontais quanto nos canais radiculares [bolsa periodontal: 42,8 (16,6 – 164) EU/mL e canal radicular: 0,01 (0,01 – 0,01) EU/mL].

A tabela 5 mostra o panorama dos níveis de endotoxinas antes e após o preparo químico-mecânico e após a utilização da medicação intracanal nas bolsas periodontais e canais radiculares.

Tabela 5. Mediana (valor mínimo e máximo) dos níveis de endotoxina EU/mL antes do preparo químico-mecânico, após o preparo químico-mecânico e após medicação intracanal nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário (n = 10).

Coleta	Etapa do tratamento endodôntico		
	C1	C2	C3
BP	160,8 (85,4 – 363) ^{C,b}	110,0 (60 – 158,5) ^{B,b}	42,8 (16,6 – 164) ^{A,b}
CR	0,10 (0,1 – 0,1) ^{C,a}	0,02 (0,01 – 0,1) ^{B,a}	0,01 (0,01 – 0,01) ^{A,a}

BP: bolsa periodontal; CR: canal radicular; C1: coleta inicial; C2: coleta após o preparo químico-mecânico; C3: coleta após 30 dias de medicação intracanal.

Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas no Teste de Wilcoxon ($p < 0,05$).

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas no teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$).

5.6. Quantificação de ácido lipoteicóico (LTA)

5.6.1. Efeito do preparo químico-mecânico nos níveis de ácido lipoteicóico nas bolsas periodontais

Foram detectados níveis de ácido lipoteicóico em todas as coletas iniciais (C1) de bolsas periodontais de dentes com lesão periodontal primária com envolvimento endodôntico secundário (10/10), com mediana igual a 604,5 Pg/mL e valores mínimo e máximo de 312 e 884 Pg/mL, respectivamente.

Após o preparo químico-mecânico (C2), os níveis de LTA nas bolsas periodontais foram significativamente inferiores aos encontrados nas coletas iniciais. O preparo químico-mecânico promoveu uma redução de 34,49% [396,0 (127 – 715) Pg/mL] nos níveis de LTA.

5.6.2. Efeito da medicação intracanal nos níveis de ácido lipoteicóico nas bolsas periodontais

Trinta dias após a utilização de uma medicação intracanal à base de hidróxido de cálcio, foram detectados níveis de LTA nas bolsas periodontais [432,5 (22 – 628) Pg/mL]. A medicação intracanal promoveu uma redução de 28,45% nas bolsas periodontais em relação às coletas iniciais, com diferenças estatisticamente significantes entre ambas as etapas do tratamento endodôntico.

Foi observado um aumento nos níveis de LTA se comparado as coletas realizadas após a utilização da medicação intracanal e após o preparo químico-mecânico, entretanto, estes valores não são estatisticamente significantes. Portanto, a medicação intracanal não mostrou efeito adicional na neutralização de produtos de bactérias Gram-positivas.

5.6.3. Efeito do preparo químico-mecânico nos níveis de ácido lipoteicóico nos canais radiculares

Níveis de ácido lipoteicóico foram detectados em todos os canais radiculares (10/10) nas coletas iniciais, realizadas antes do preparo químico-mecânico, com mediana igual a 350,5 Pg/mL e valores mínimo e máximo iguais a 252

e 588 Pg/mL, respectivamente.

Após a realização do preparo químico-mecânico (C2), houve redução de 11,55% [310,0 (108 – 464) Pg/mL] nos níveis de ácido lipoteicóico, entretanto, sem diferença estatística comparado à coleta inicial.

5.6.4. Efeito da medicação intracanal nos níveis de ácido lipoteicóico nos canais radiculares

Posteriormente ao uso de uma medicação intracanal à base de hidróxido de cálcio, os níveis de ácido lipoteicóico foram iguais a 182,5 (65 – 518) Pg/mL. Comparado aos valores da coleta inicial, houve uma redução estatisticamente significativa de 47,93%.

Entretanto, a mesma diferença não é observada se comparar o período pós preparo químico-mecânico e pós medicação intracanal, com redução nos níveis de ácido lipoteicóico de 41,12%.

5.6.5. Comparação dos níveis de ácido lipoteicóico nas bolsas periodontais e nos canais radiculares nas diferentes etapas do tratamento endodôntico

Os níveis iniciais de ácido lipoteicóico nas bolsas periodontais foram maiores que nos canais radiculares nas coletas antes do preparo químico-mecânico.

O preparo químico-mecânico foi mais efetivo na redução dos níveis de ácido lipoteicóico nas bolsas periodontais do que nos canais radiculares, entretanto, a comparação nos níveis de ácido lipoteicóico nas bolsas periodontais e canais radiculares na coleta após o preparo químico-mecânico não apresentaram diferenças significativamente estatísticas.

A medicação intracanal foi efetiva no controle do conteúdo infeccioso tanto nas bolsas periodontais quanto nos canais radiculares quando comparadas com as coletas iniciais e não apresentou efeito adicional após o preparo químico-mecânico em nenhum dos sítios.

A tabela 6 apresenta os valores dos níveis de ácido lipoteicóico antes e após o preparo químico-mecânico e após a utilização da medicação intracanal nas

bolsas periodontais e canais radiculares.

Tabela 6. Mediana (valor mínimo e máximo) dos níveis de ácido lipoteicóico (Pg/mL) antes do preparo químico-mecânico, após o preparo químico-mecânico e após medicação intracanal nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário (n = 10).

Coleta	Etapa do tratamento endodôntico		
	C1	C2	C3
BP	604,5 (312 – 884) ^{B,b}	396,0 (127 – 715) ^{A,a}	432,5 (22 – 626) ^{A,a}
CR	350,5 (252 – 588) ^{B,a}	310,0 (108 – 464) ^{AB,a}	182,5 (65 – 518) ^{A,a}

BP: bolsa periodontal; CR: canal radicular; C1: coleta inicial; C2: coleta após o preparo químico-mecânico; C3: coleta após 30 dias de medicação intracanal.

Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas no teste de Wilcoxon ($p < 0,05$).

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas no teste de Mann-Whitney.

6 DISCUSSÃO

As doenças periodontais estão entre as doenças infecciosas orais mais comuns associadas ao estabelecimento de um biofilme altamente patogênico que desencadeia uma resposta imune/inflamatória do hospedeiro, levando à destruição de tecidos periodontais de suporte e eventual perda do elemento dental (Eke et al., 2012; Meyle & Chapple, 2015; Vieira Colombo et al., 2016). Desta maneira, a doença periodontal caracteriza-se por um processo inflamatório localizado com degradação tecidual, redução na população celular, reabsorção, fibrose e necrose por coagulação (Seltzer et al., 1963; Rubach & Mitchell, 1965; Stahl, 1966; Mandi, 1972; Sinais & Soltanoff, 1973; Langeland et al., 1974). Em virtude da progressão lenta das lesões periodontais, estas podem exercer um efeito deletério sobre os tecidos pulpares (Duque et al., 2018). Além disso, terapias periodontais como raspagem e alisamento radicular podem acelerar a inflamação pulpar, provocando o processo de doença inter-relacionado (Seltzer et al., 1963; Stahl, 1966; Stallard, 1972).

Em nosso estudo foram incluídos 10 dentes com bolsas periodontais maiores ou igual a 6 mm e vitalidade pupar, porém com resposta anormal aos testes de sensibilidade ao frio, assim como foi no estudo de Dosseva et al. (2007). Para inclusão dos pacientes na pesquisa, estes deveriam estar em acompanhamento periodontal por, no mínimo, 6 meses, porém, sem resposta positiva à terapia de suporte. De maneira geral, estes pacientes apresentavam dentes com canais atrésicos que poderiam ser visualizados radiograficamente e clinicamente, polpa dental fibrosada e, em alguns casos, presença de nódulos pulpares, concordando com estudos prévios (Seltzer & Bender, 1959; Seltzer et al., 1963; Sinai & Soitanoff, 1973; Lontelme et al., 1976).

A média de idade dos pacientes incluídos neste estudo foi de 31 (± 16) anos, sendo que a maioria (60%) era composta por mulheres. Um fato importante foi que todos os dentes estavam hígidos no momento do atendimento clínico. Além disso, apresentaram bolsas periodontais profundas [9 ($\pm 1,69$) mm] e nível de inserção clínica de 10,2 ($\pm 1,98$) mm e todos com mobilidade dental, evidenciando, como única fonte de micro-organismos, a bolsa periodontal. Nenhum dos pacientes apresentou qualquer tipo de sintomatologia no momento do atendimento.

Tanto nas doenças periodontais como nas endodônticas, o principal fator etiológico é a presença de biofilme bacteriano (Takehashi et al., 1965; Mandel et al., 1993; Gomes et al., 2015) que, devido à presença de vias de comunicação entre estes dois tecidos como túbulos dentinários expostos, canais laterais e acessórios e forame apical (Rotstein et al., 2017), podem estar presentes em ambos os sítios simultaneamente. Diante da íntima relação entre as lesões periodontais e pulpares, o presente estudo investigou a microbiota por meio de métodos moleculares e quantificou os níveis de endotoxinas e ácido lipoteicoico em canais radiculares e bolsas periodontais de dentes submetidos à terapia endodôntica com doença periodontal crônica com envolvimento endodôntico secundário, antes e após o preparo químico-mecânico e após o uso de uma medicação intracanal à base de hidróxido de cálcio por 30 dias.

Até o momento, estudos indicam a realização do tratamento endodôntico em casos de lesões endodônticas periodontais combinadas, onde o tecido pulpar encontra-se necrosado (Gomes et al., 2015), entretanto, em casos de dentes com doença periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário, com presença de vitalidade pulpar, ainda que alterada, a literatura ainda não é unânime na indicação da terapia endodôntica. Estudos recentes indicam que diante de casos em que a terapia periodontal por si só não é capaz de reestabelecer saúde dos tecidos periodontais, a realização do tratamento endodôntico tem sido indicada como uma terapia coadjuvante, mesmo na presença de polpa vital (Duque et al., 2018).

O conhecimento da microbiota envolvida na patogênese da lesão periodontal primária com envolvimento endodôntico secundário é de fundamental importância para o desenvolvimento de estratégias para o combate eficaz dos microorganismos envolvidos e, conseqüentemente, para um prognóstico favorável e restabelecimento da condição de saúde do indivíduo. Até o momento, a literatura ainda é extremamente limitada em relação a estudos que investigam a microbiota em bolsas periodontais e canais radiculares com polpa vital.

A realização das coletas clínicas foi realizada com cones de papel estéreis e apirogênicos. Considerando as limitações deste tipo de coleta, este método é bem estabelecido na literatura (Siqueira et al., 2007; Gomes et al., 2015; Barbosa-Ribeiro

et al., 2016), baseado no fato de que estão sendo coletados espécies pertencentes a biofilmes que estão flutuantes no canal radicular são pertencentes a biofilmes presentes no sistema de canais radiculares (Berezow & Darveau, 2011). Para a avaliação da microbiota de bolsas periodontais e/ou canais radiculares, diversos estudos utilizaram-se de cones de papel para a realização das coletas microbianas (Gomes et al., 2015; Barbosa-Ribeiro et al., 2016; Nóbrega et al., 2016; Hoedke et al., 2018; Duque et al., 2018). Além disso, VMGA III é frequentemente utilizado como meio de transporte, evitando perda microbiana até o processamento laboratorial (Gomes et al., 2015; Nóbrega et al., 2016).

O método molecular para identificação microbiana, Nested PCR, é uma técnica que permite a detecção de DNA microbiano que apresenta uma sensibilidade de cerca de 10 células-alvo para as espécies, sendo superior às técnicas de PCR simples (10 a 10² células) (Gomes et al., 2008; Endo et al., 2013; Duque et al., 2018). Outro ponto positivo da técnica utilizada no presente estudo é a capacidade de identificar espécies microbianas de difícil cultivo, incluindo as fastidiosas (Gomes et al., 2008; Endo et al., 2013; Duque et al., 2018). O presente estudo revelou a presença de uma microbiota complexa, composta por bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, anaeróbias facultativas e anaeróbias estritas. Além disso, a utilização desta técnica permitiu o monitoramento das diferentes etapas dos procedimentos endodônticos, tais como preparo químico-mecânico e medicação intracanal sobre os patógenos endodônticos/periodontais.

Nossos resultados mostraram a presença de bactérias do complexo vermelho (*Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* e *Tanarella forsythia*), frequentemente associadas a doença periodontal severa, corroborando com estudo prévios (Duque et al., 2018). Além destas, outras bactérias altamente resistentes e frequentemente isoladas em casos de insucesso do tratamento endodôntico como *Enterococcus faecalis* (Endo et al., 2013; Barbosa-Ribeiro et al., 2016) também foram frequentemente identificadas nas bolsas periodontais, concordando com estudo de Gomes et al. (2015). Em relação às coletas iniciais dos canais radiculares, foi observado a presença de *Fusobacterium nucleatum*, espécie frequentemente associada à infecção endodôntica, entretanto, para a nossa surpresa, não foram detectados *Parvimonas micra* e *Prevotella intermedia*, igualmente associadas à

patogenia endodôntica. Desta maneira, nossos resultados divergem parcialmente de outros estudos (Gomes et al., 2015; Duque et al., 2018).

Enterococcus faecalis, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella nicrescens* e *Tanarella forsythia* *Actinomyces naeslundii*, *Filifactor alocis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella tanneriae* e *Streptococcus sobrinus* foram espécies microbianas encontradas nas bolsas periodontais e canal radiculares ao mesmo tempo, o que evidencia a importância das vias de comunicação existentes entre polpa e periodonto e também a capacidade de o tecido periodontal atuar como um reservatório de microorganismos, fato evidenciado em outras investigações (Gomes et al., 2015; Alyahya et al., 2017; Rotstein et al., 2017; Duque et al., 2018).

Outro método molecular que permite investigar a microbiota, independente da condição clínica, e em um período de tempo relativamente curto é a técnica do *Checkerboard DNA-DNA hybridization*. Esta técnica permite o cruzamento de até 28 amostras clínicas coletadas com 40 sondas de DNA bacteriano previamente conhecido (Socransky et al., 2004; Sakamoto et al., 2006).

Nossos resultados mostraram que, assim como no Nested PCR, o *Checkerboard DNA-DNA hybridization* se mostrou uma metodologia capaz de detectar a presença de uma microbiota complexa, concordando com estudos de Siqueira et al. (2000) e Vianna et al. (2008) onde foram estudados dentes com infecções primárias. Assim como o nosso trabalho que avaliou dois sítios distintos (bolsa periodontal e canal radicular), Rôças et al. (2015) compararam bactérias presentes sítios diferentes (lesões de cárie e canais radiculares) de dentes com pulpite irreversível.

Quarenta sondas foram utilizadas para a realização do *Checkerboard DNA-DNA hybridization* na investigação da microbiota de dentes com lesão periodontal primária com envolvimento endodôntico secundário. Destas, 39 espécies microbianas foram detectadas em alguma etapa do tratamento endodôntico nas bolsas periodontais, enquanto que nos canais radiculares, este número foi de 25.

Foi encontrada maior carga microbiana nas bolsas periodontais comparadas aos canais radiculares, confirmando os resultados obtidos pelo Nested

PCR. Nas bolsas periodontais, as espécies mais prevalentes foram *Fusobacterium periodonticum* (7/10), *Capnocytophaga ochracea* (5/10) e *Fusobacterium nucleatum* (5/10). Nos canais radiculares, as espécies mais prevalentes foram *Fusobacterium nucleatum* (8/10), *Enterococcus hirae* (7/10) e *Capnocytophaga ochracea* (5/10). A presença de bactérias comuns aos dois sítios sugere importantes vias de comunicação entre estes tecidos (Rovai, 2014; Gomes et al., 2015; Duque et al., 2018).

Das bactérias avaliadas pelo *Checkerboard DNA-DNA hybridization* nas coletas microbiológicas das bolsas periodontais, 12 apresentaram carga microbiana maior que 10^5 e menor 10^6 células e uma (*Fusobacterium nucleatum*) apresentou carga aproximadamente igual a 10^6 células. Por outro lado, nos canais radiculares, apenas 2 espécies apresentaram a mesma quantidade de carga microbiana. Tal fato enfatiza a maior complexidade e carga microbiana das bolsas periodontais comparadas aos canais radiculares, que atuam como fonte primária de microorganismos.

No presente estudo, *Enterococcus faecalis* e *Porphyromonas gingivalis* foram duas espécies frequentemente isoladas nas bolsas periodontais e canais radiculares, concordando com Gomes et al. (2015). Entretanto, a utilização do *Checkerboard DNA-DNA hybridization* na detecção destas duas espécies subestimou a presença de ambas. Desta forma, a associação entre os dois métodos moleculares foi importante para uma caracterização mais precisa da microbiota presente nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com polpa vital associados à doença periodontal. Nossos resultados mostraram que a técnica de PCR é mais sensível na detecção de patógenos endodônticos/periodontais comparados ao *Checkerboard DNA-DNA hybridization*, corroborando com estudos prévios (Siqueira et al., 2000, Rôças et al., 2015). Foram realizadas 84 análises comparativas entre estes dois métodos e o Nested PCR foi mais sensível na detecção de espécies microbianas em 62 análises. Também foi observado similaridade entre ambas as técnicas. Em apenas um caso, para a detecção de *A. actinomycetemcomitans*, o *Checkerboard DNA-DNA hybridization* foi mais sensível que o Nested PCR.

A endotoxinas são o principal fator de virulência das bactérias Gram-

negativas. Estas são as mais importantes moléculas inflamatórias presentes na membrana externa de bactérias Gram-negativas (Schein & Schilder 1975; Martinho et al., 2018; Duque et al., 2018), liberadas durante multiplicação ou morte celular e capaz de estimular tecidos mesmo em baixos níveis (Garcia et al., 2009; Martinho et al., 2018). A destruição tecidual em infecções endodôntica e periodontal ocorre devido ao estímulo de citocinas pró-inflamatórias do hospedeiro induzidas pelas endotoxinas (Garcia de Aquino et al., 2009; Duque et al., 2018).

O Lisado de Amebócito *Limulus* (LAL), método turbidimétrico quantitativo, apresenta alta sensibilidade à presença de endotoxinas, favorecendo uma melhor avaliação das amostras, assim como demonstrado por Martinho et al. 2010 e Martinho et al. 2011. Nossos resultados mostraram maiores concentrações de endotoxinas nas bolsas periodontais comparados aos canais radiculares em todas as etapas do tratamento endodôntico, corroborando com estudo prévio (Duque et al., 2018). Tal fato se relaciona ao maior período de duração da infecção periodontal (fonte primária de micro-organismos) comparado à endodôntica e o tipo de colonização microbiana (grande número de bactérias Gram-negativas). Além disso, o tecido pulpar, apesar de responder de maneira anormal aos testes de sensibilidade pulpar, não se encontra necrosado e, portanto, ainda apresenta capacidade de defesa, resistindo à penetração de micro-organismos (Love & Tanner, 2017), especialmente os Gram-negativos.

Os valores iniciais dos níveis de endotoxinas encontrados nas bolsas periodontais foram de 160,8 (85,4 – 363) enquanto que, nos canais radiculares, estes valores foram de 0,1 (0,1 – 0,1). Estes dados estão de acordo com estudo prévio (Rovai, 2014; Duque et al., 2018). Após a realização do preparo químico-mecânico, os níveis de endotoxinas nas bolsas periodontais e canais radiculares foram reduzidos. Diversos estudos evidenciam a eficácia do preparo-químico-mecânico na redução do conteúdo infeccioso dos canais radiculares e bolsas periodontais (Gomes et al., 2009; Endo et al., 2012; Rovai, 2014; Herrera et al., 2017). Após 30 dias de medicação intracanal, os níveis de endotoxinas foram significativamente reduzidos tanto nas bolsas periodontais quanto nos canais radiculares, corroborando com a literatura (Martinho et al., 2010, 2011; Duque, 2013; Rovai, 2014; Duque et al. 2018; Martinho et al., 2018).

Com isso, o presente estudo evidenciou a importância do tratamento endodôntico, tanto do preparo químico-mecânico, como da medicação intracanal, na redução dos níveis de endotoxinas nas bolsas periodontais e canais radiculares. Optou-se pela utilização de uma medicação intracanal à base de hidróxido de cálcio por 30 dias, uma vez que quando utilizada por período inferior (7 ou 14 dias), não promoveu efeito adicional ao PQM (Berber, 2009; Endo et al., 2013). Por outro lado, este trabalho evidenciou a importância da MIC por 30 dias no controle do conteúdo infeccioso e endotóxico dos canais radiculares, concordando com os resultados de Marinho et al. (2014), Sousa et al. (2014) e Barbosa-Ribeiro et al. (2018) e das bolsas periodontais (Duque et al., 2018).

Assim como as bactérias Gram-negativas apresentam as endotoxinas na sua composição, o principal fator de virulência das bactérias Gram-positivas é o ácido lipoteicóico, liberado durante a multiplicação ou lise bacteriana (Ginsburg et al., 2002; Barbosa-Ribeiro et al., 2016). O ácido lipoteicóico apresenta propriedades patogênicas similares às endotoxinas (Ginsburg et al., 2002; Han et al., 2003; Wang et al., 2003; Hahn & Liewehr, 2007; Siqueira & Rôças, 2007; Ryu et al., 2009; Barbosa-Ribeiro et al., 2016), e é capaz de causar efeitos sobre a polpa e periodonto.

Por meio do teste de ELISA é possível quantificar os níveis de ácido lipoteicóico presentes nas amostras. No presente estudo, foram detectados níveis de ácido lipoteicóico tanto nas bolsas periodontais como nos canais radiculares. Até o momento, são raros os estudos clínicos que envolvem a quantificação de LTA (Barbosa-Ribeiro et al., 2016), portanto, este ainda é um tema que necessita de maiores estudos, especialmente em casos de lesões periodontais primárias com envolvimento endodôntico secundário, com o objetivo de compreender o real papel da presença do ácido lipoteicóico nestes casos.

Nas coletas iniciais, maiores níveis de ácido lipoteicóico foram detectados nas bolsas periodontais comparados aos canais radiculares, evidenciando maior carga microbiana neste sítio [BP:604,5 (312 – 484) e CR: 350,5 (252 – 588)]. O preparo químico-mecânico foi eficaz na redução de ácido lipoteicóico nas bolsas periodontais, entretanto, apesar de haver redução também nos canais radiculares, não foi significativa. Após 30 dias de medicação intracanal, os níveis de ácido

lipoteicóico foram significativamente menores tanto nas bolsas periodontais quanto nos canais radiculares comparados às coletas iniciais. De maneira geral, os procedimentos endodônticos combinados (preparo químico-mecânico e medicação intracanal) apresentam efeitos positivos na redução de ácido lipoteicóico. Apesar de ainda existirem poucos estudos na literatura investigando os efeitos do tratamento endodôntico na redução de LTA, nossos resultados corroboram com os achados de Barbosa-Ribeiro et al. 2016, que também observaram a efetividade do tratamento endodôntico na redução deste fator de virulência de bactérias Gram-positivas.

Uma observação importante neste estudo diz respeito aos altos níveis de ácido lipoteicóico nas bolsas periodontais comparados aos canais radiculares, entretanto, após o tratamento endodôntico, estes níveis não apresentaram diferenças entre si. Entretanto, ainda não é possível prever os valores mínimos de LTA para que possa haver um reparo tecidual efetivo. Desta maneira, se faz necessário a preservação com coleta de bolsas periodontais destes pacientes, com o objetivo de compreender o real efeito dos procedimentos endodônticos no prognóstico destes dentes.

Apesar disso, sabe-se que a indicação do tratamento endodôntico tem que mostrado efeitos positivos com regressão de sinais clínicos, tais como, redução da mobilidade dental e bolsa periodontal. Tem-se sugerido que o canal radicular atua como um reservatório de medicação intracanal que se difunde para os tecidos periodontais, alterando a composição microbiana (Duque et al., 2018). Desta forma, existe uma modificação com redução de espécies Gram-negativas e aumento do número de espécies Gram-positivas, que estão mais associadas à condição de saúde (Duque et al., 2018).

Além da investigação da microbiota de bolsas periodontais e canais radiculares e de seus subprodutos como as endotoxinas e ácido lipoteicóico, é de grande importância o monitoramento dos aspectos imunológicos relacionados aos hospedeiros nas diferentes etapas do tratamento endodôntico. Com isso, novas estratégias de terapia para maior previsibilidade e melhor prognóstico poderão ser desenvolvidas.

7 CONCLUSÃO

Baseado nas metodologias empregadas, conclui-se que a microbiota das BP e CR de dentes com vitalidade pulpar e doença periodontal associada é polimicrobiana, com presença de bactérias Gram-negativas, Gram-positivas, anaeróbias facultativas e estritas. O PQM e a MIC promoveram redução do conteúdo infeccioso das BP e CR. Os métodos utilizados foram eficazes para a caracterização da microbiota das BP e CR. O PQM e a MIC foram efetivos na redução dos níveis de LPS nas BP e CR. A MIC foi eficaz na redução dos níveis de LTA nas BP e CR. O tratamento endodôntico apresenta efeito coadjuvante no tratamento de dentes com vitalidade pulpar e doença periodontal associada.

REFERÊNCIAS

Abariga SA, Whitcomb BW. Periodontitis and gestational diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2016 Nov 8;16(1):344.

Abbott PV, Salgado JC. Strategies for the endodontic management of concurrent endodontic and periodontal diseases. *Aust Dent J*. 2009; 54: 70–85.

Adriaens PA, Edwards CA, De Boever JA, Loesche WJ. Ultrastructural observations on bacterial invasion in cementum and radicular dentin of periodontally diseased human teeth. *J Periodontol*. 1988; 59: 493-496.

Aguiar TRS, Lotufo RF, Jaegger M, Mandarino D. Histopathological study of human pulps in teeth with aggressive periodontitis. *J Dent Res*. 2002; 81: 151.

Aguiar TRS. Estudo histopatológico da polpa de dentes humanos portadores de doença periodontal envolvendo o ápice radicular [tese]. São Paulo:FO/USP; 1999.

Al-Fouzan K. A New Classification of Endodontic-Periodontal Lesions. *Int J Dent*. 2014; 2014: 919173.

Alyahya A, Alqareer A. Does the Removal of Cementum Facilitate Bacterial Penetration into Dentinal Tubules In Vitro? *J Endod*. 2017 Jul;43(7):1111-1115.

Anand PS, Nandakumar K. Management of Periodontitis Associated with Endodontically Involved Teeth: A Case Series. *J Comtemp Dent Pract*. 2005; 6: 118-129.

Andreasen JO, Andreasen FM, Skeie A, Hjørting-Hansen E, Schwartz O. Effect of treatment delay upon pulp and periodontal healing of traumatic dental injuries -- a review article. *Dent Traumatol*. 2002 Jun; 18(3):116-28.

Aqrabawi J, Jarbawi MM. The healing potential of periodontal-endodontic lesions. *Int Dent J.* 2004; 54: 166-70.

Barbosa-Ribeiro M, De-Jesus-Soares A, Zaia AA, Ferraz CC, Almeida JF, Gomes BP. Quantification of lipoteichoic acid contents and cultivable bacteria at the different phases of the endodontic retreatment. *J Endod.* 2016; 42: 552-556

Baumgartner JC, Khemaleelakul SU, Xia T. Identification of spirochetes (treponemes) in endodontic infections. *J Endod* 2003; 29: 794-797.

Baumgartner JC. Endodontic microbiology. In: Walton RE, Torabinejad M, editors. *Principles and practice of endodontics.* 3rd ed. Philadelphia: Saunders Co.; 2002. p. 282-293.

Becerra N, Villalobos AM, Fuentes EM. Estúdio sobre relation entre periodontitis avanzada y repuesta a test de vitalidade pulpar em piezas dentarias sin caries ni obturaciones. *R. Periodontia.* 1993; 2: 100-106.

Belibasakis GN, Kast JI, Thurnheer T, Akdis CA, Bostanci N. Virulence. The expression of gingival epithelial junctions in response to subgingival biofilms. *Virulence.* 2015;6(7):704-9.

Bender IB, Seltzer S. The effect of periodontal disease on the pulp. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1972; 33: 458–474.

Berber VB. Identificação da microbiota das lesões endo-periodontais por cultura e PCR e sua suscetibilidade ao PQM e a medicações intracanaís entre sessões de atendimento. 2009. 250p. Tese (Doutorado em clínica odontológica-Piracicaba)-Universidade Estadual de Campinas.

Berezow AB, Darveau RP. Microbial shift and periodontitis. *Periodontol* 2000. 2011 Feb;55(1):36-47.

Bergenholtz G, Hasselgren G. Endodontia e Periodontia. In: Lindhe J. Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral. 3 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 1999. p. 207–232.

Bergenholtz G, Lindhe J. Effect of experimentally induced marginal periodontitis and periodontal scaling on the dental pulp. *J Clin Periodontol.* 1978; 5: 59–73.

Bergenholtz G, Lindhe J. Effect of soluble plaque factors on inflammatory reactions in the dental pulp. *Scand J Dent Res.* 1975; 83: 153–158.

Blonlöf L, Lindskog S, Hammarström L. Influence of pulpal treatments on cell and tissue reactions in the marginal periodontium. *J Periodontol.* 1988; 59: 577-583.

Bozbay E, Dominici F, Gokbuget AY, Cintan S, Guida L, Aydin MS, Mariotti A, Pilloni A. Preservation of root cementum: a comparative evaluation of power-driven versus hand instruments. *Int J Dent Hyg.* 2018 May;16(2):202-209.

Buduneli N, Kinane DF. Host-derived diagnostic markers related to soft tissue destruction and bone degradation in periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2011; 11: 85-105.

Byström A, Claesson R, Sundqvist G. The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. *Endod Dent Traumatol.* 1985 Oct;1(5):170-5.

Cahn L. Pathology of pulps found in pyorrhetic teeth. *Dent Items Interest.* 1927; 49: 598- 617.

Cardon EB, Waick RC, Rosing CK. Analysis of pulp sensitivity in teeth with different degrees of periodontal. *Periodontia.* 2007; (3): 49-54.

Carrote P. Endodontics: Part 9 Calcium hydroxide, root resorption, endo-perio lesions. *Br Dent J.* 2004 Dec 25;197(12):735-43.

Caviedes-Bucheli J, Gomez-Sosa JF, Azuero-Holguin MM, Ormeño-Gomez M, Pinto-Pascual V, Munoz H.R. Angiogenic mechanisms of human dental pulp and their relationship with substance P expression in response to occlusal trauma. *Int Endod J*. 2017; 50: 339-351.

Caviedes-Bucheli J, Muñoz HR, Azuero-Holguín MM, Ulate E. Neuropeptides in dental pulp: the silent protagonists. *J Endod*. 2008; 34: 773-788.

Cesconetto L, Azeredo RA, Araujo Siqueira C, Bissoli NC. Avaliação da presença do canal cavo inter-radicular em molares pelo método da microscopia eletrônica de varredura. *Rev. odontol. UNESP [online]*. 2016, vol.45, n.3, pp.165-170

Chacker FM. The endodontic-periodontic continuum. *Dent Clin N Amer*. 1974; 18 (2): 383-414.

Chapola RC. Lesões endo-periodontais combinadas: caracterização microbiológica e endotóxica. Piracicaba, 2017. 181p. Tese (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.

Chen S-Y, Wang H-L, Glickman GN. The influence of endodontic treatment upon periodontal wound healing. *J Clin Periodontol*. 1997; 24: 449-456.

Chilton NW, Fertig JW. Pulp responses of bilateral intact teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1972; 33: 797–800.

Christie WH, Holthuis AF. The endo-perio problem in dental practice: diagnosis and prognosis. *J Can Dent Assoc*. 1990; 56: 1005-1011.

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 Nov;11(11):1587-99.

Cohen S, Hargreaves KM. *Caminhos da Polpa*. 11ª ed., Ed. Elsevier Editora Ltda. Rio

de Janeiro, 2017.

Consensus report. Periodontal disease: pathogenesis and microbial factors. *Ann Periodontol.* 1996;1:926-932.

Czarnecki R, Schilder AA. A histological evaluation of the human pulp in teeth with varying degrees of periodontal disease. *J Endod.* 1979; 5: 242-253.

De Deus QD. *Endodontia*. 5. ed. Rio de Janeiro: MEDSCI; 1992.

Delzangles B. Apical periodontitis and resorption of the root canal wall. *Endod Dent Traumatol.* 1988 Dec;4(6):273-7.

Dewhirst FE, Chen T, Izard J, Paster BJ, Tanner AC, Yu WH, Lakshmanan A, Wade WG. The human oral microbiome. *J Bacteriol* 2010; 192: 5002–5017.

Dosseva V, Mlachkova A, Gusiyska A. Evaluation of the pulp vitality in patients with periodontitis, *J of IMAB.* 2007; 13 (2): 19-20.

Duque TM, Prado M, Herrera DR, Gomes BPF. Periodontal and endodontic infectious/inflammatory profile in primary periodontal lesions with secondary endodontic involvement after a calcium hydroxide-based intracanal medication. *Clin Oral Investig.* 2018 Mar 23.

Duque TM. Análise microbiológica por PCR, quantificação de endotoxinas e monitoramento inflamatório em pacientes com doença periodontal crônica. Piracicaba, 2016. 120p. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de campinas.

Duque TM. Avaliação da influência do tratamento endodôntico em pacientes com doença periodontal crônica através da análise microbiológica por PCR e quantificação de endotoxinas e citocinas pró-inflamatórias. Piracicaba, 2013. Tese (Mestrado) – Universidade Estadual de campinas.

Ehnevid H, Jansson L, Lindskog S, Weintraub A, Blomlof L. Endodontic pathogens: propagation of infection through patent dentinal tubules in traumatized monkey teeth. *Endod Dent Traumatol*, 1995; 11: 229-34.

Eke PI, Dye BA, Wei L, Thornton-Evans GO, Genco RJ. Prevalence of periodontitis in adults in the United States: 2009 and 2010. *J Dent Res* 2012; 91: 914–920.

Eke PI, Thornton-Evans G, Dye B, Genco R, Advances in surveillance of periodontitis: the centers for disease control and prevention periodontal disease surveillance project, *J. Periodontol.* 83 (2012) 1337e1342.

EISalhy M, Azizieh F, Raghupathy R. Cytokines as diagnostic markers of pulpal inflammation. *Int Endod J* 2012; 46: 573-580.

Endo MS, Ferraz CC, Zaia AA, Almeida JF, Gomes BP. Quantitative and qualitative analysis of microorganisms in root-filled teeth with persistent infection: Monitoring of the endodontic retreatment. *Eur J Dent.* 2013; 7: 302-309.

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

Estrela C, Pesce HF. Chemical analysis of the formation of calcium hydroxyl ions of calcium hydroxide pastes in the presence of connective tissue of the dog. Part I. *Braz Dent J.* 1996; 7:41-6.

Fabricius L, Dahlén G, Holm SE, Möller AJ. Influence of combinations of oral bacteria on periapical tissues of monkeys. *Scand J Dent Res* 1982; 90: 200-206.

Fachin EVF, Luisi SB, Borba MG. Relação Pulpo-periodontal: Considerações Histológicas e Clínicas. *Rev Fac Odontol Porto Alegre.* 2001; 42: 9-15.

Feinberg AP, Vogelstein B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem.* 1983; 132: 6-13.

Ferraz CC, Gomes BP, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. In vitro assessment of the antimicrobial action and the mechanical ability of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant. *J Endod.* 2001 Jul;27(7):452-5.

Fonseca TS, Silva GF, Guerreiro-Tanomaru JM, Delfino MM, Sasso-Cerri E, Tanomaru-Filho M, Cerri PS. Biodentine and MTA modulate immunoinflammatory response favoring bone formation in sealing of furcation perforations in rat molars. *Clin Oral Investig.* 2018 Jul 7.

Gadê-Neto CR. EStudo microbiológico da bolsa periodontal e canais radiculares de dentes de cães com doença periodontal induzida [dissertação]. Piracicaba/ FOP Unicamp. 2000.

Garcia de Aquino S, Manzolli Leite FR, Stach-Machado DR, Francisco da Silva JA, Spolidorio LC, Rossa C Jr (2009) Signaling pathways associated with the expression of inflammatory mediators activated during the course of two models of experimental periodontitis. *Life Sci* 84:745–754.

Ginsburg I. Role of lipoteichoic acid in infection and inflammation. *Lancet Infect Dis* 2002; 2:171-179.

Gomes BP, Endo MS, Martinho FC. Comparison of endotoxin levels found in primary and secondary endodontic infections. *J Endod.* 2012; 38:1082-1086.

Gomes BP, Jacinto RC, Montagner F, Sousa EL, Ferraz CC. Analysis of the antimicrobial susceptibility of anaerobic bacteria isolated from endodontic infections in Brazil during a period of nine years. *J Endod.* 2011; 37:1058-1062.

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: 211-215.

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; 32:937-40b.

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: 1350-1353b.

Gomes BP, Montagner F, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, de Almeida JF, Souza-Filho FJ. Antimicrobial action of intracanal medicaments on the external root surface. *J Dent.* 2009; 37: 76-81a.

Gomes BP, Montagner F, Jacinto RC, Pinheiro ET, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ. *Gemella morbillorum* in primary and secondary/persistent endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008; 105:519-25b.

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.

Gomes BP, Pinheiro ET, Gade-Neto CR, Sousa EL, Ferraz CC, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiol Immunol.* 2004; 19: 71-6.

Gomes BP, 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; 34:537-40a.

Gomes BP, Vianna ME, Zaia AA, Almeida JF, Souza-Filho FJ, Ferraz CC.

Chlorhexidine in endodontics. *Braz Dent J.* 2013;24(2):89-102.

Gomes BPF, Berber VB, Kokaras AS, Chen T, Paster BJ. Microbiomes of Endodontic- Periodontal Lesions before and after chemomechanical preparation. *J Endod.* 2015; 41: 1975–1984.

Gomes BPF, Drucker DB, Lilley JD. Association of specific bacteria with some endodontic signs and symptoms. *Int Endod J.* 1994; 27: 291-8.

Gomes BPF. Investigação dos micro-organismos envolvidos na sintomatologia e no insucesso do tratamento endodôntico. Piracicaba, 2002. Tese (Livre Docência) – Universidade Estadual de Campinas.

Gomes BPF, Lilley JD, Drucker DB. Clinical significance of dental root canal microflora. *J Dent.* 1996; 29: 47-55.

Gomes BPF, Montagner F, Martinho FC. Aspectos microbiológicos das infecções endodônticas. In: Spolidorio DMP & Duque C. (Org.). *Microbiologia e Imunologia Geral e Odontológica.* 1ed. São Paulo: Artes Médicas, 2013. v. 1, p. 100-11.

Gomes BPF, Vianna ME, Sena NT, Zaia AA, Ferraz CCR, Souza-Filho FJ. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of calcium hydroxide combined with chlorhexidine gel used as intracanal medicament. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006; 102: 544-550a.

Goutoudi P, Diza E, Arvanitidou M. Effect of periodontal therapy on crevicular fluid interleukin-1beta and interleukin-10 levels in chronic periodontitis. *J Dent.* 2004; 32: 511-520.

Grossi SG, Genco RJ. Periodontal disease and diabetes mellitus: a two-way relationship. *Ann Periodontol.* 1998 Jul;3(1):51-61.

Gutmann JL. Prevalence, location and patency of accessory canals in the furcation region of permanent molars. *J Periodontol.* 1978; 49: 21.

Hahn CL, Liewehr FR. Relationships between Caries Bacteria, Host Responses, and Clinical Signs and Symptoms of Pulpitis. *J Endod* 2007; 33: 213-219.

Han SH, Kim JH, Martin M, Michalek SM, Nahm MH. Pneumococcal lipoteichoic acid (LTA) is not as potent as staphylococcal LTA in stimulating Toll-like receptor 2. *Infect Immun.* 2003 Oct;71(10):5541-8.

Harrington GW, Steiner DR, Ammons Jr WF. The periodontal-endodontic controversy. *Periodontol* 2000. 2002; 30: 123-130.

Harrington GW. The perio-endo question: differential diagnosis. *Dental Clinics of North América.* 1979; 23 (4): 673-690.

Herrera DR, Martinho FC, de-Jesus-Soares A, Zaia AA, Ferraz CC, Almeida JF, Gomes BP. Clinical efficacy of EDTA ultrasonic activation in the reduction of endotoxins and cultivable bacteria. *Int Endod J.* 2017 Oct;50(10):933-940.

Herrera D, Retamal-Valdes B, Alonso B, Feres M. Acute periodontal lesions (periodontal abscesses and necrotizing periodontal diseases) and endo-periodontal lesions. *J Periodontol.* 2018 Jun;89 Suppl 1:S85-S102.

Hoedke D, Enseleit C, Gruner D, Dommisch H, Schlafer S, Dige I, Bitter K. Effect of photodynamic therapy in combination with various irrigation protocols on an endodontic multispecies biofilm ex vivo. *Int Endod J.* 2018 Jan;51 Suppl 1:e23-e34.

Jacob SP, Nath S, Zade RM. Effect of periodontal therapy on circulating levels of endotoxin in women with periodontitis: a pilot clinical trial. *Indian J Dent Res.* 2012 Nov-Dec;23(6):714-8.

Jansson L, Ehnevid H, Lindskog S, Blomløf L. Relationship between periapical and

periodontal status. A clinical retrospective study. *J Clin Periodontol*. 1993; 20: 117-123.

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 Oral Radiol and Endod* 1965; 20: 340-349.

Katchburian, E. & Arana, V. *Histologia e Embriologia Oral*. Rio de Janeiro: Guanabara, 4^a. edição, 2017.

Kerekes K, Olsen I. Similarities in the microfloras of root canals and deep periodontal pockets. *Endod Dent Traumatol*. 1990;6:1-5. Review.

Kipioti A, Nakou M, Legakis N, Mitsis F. Microbiological findings of infected root canals and adjacent periodontal pockets in teeth with advanced periodontitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1984; 58: 213-220.

Kirkham DB. The location and incidence of accessory pulp canals in periodontal pockets. *JADA*. 1975; 91: 353-356.

Kobayashi T, Hayashi A, Yoshikawa R, Okuda K, Hara K. The microbial flora from root canals and periodontal pockets of non-vital teeth associated with advanced periodontitis. *Int Endod J*. 1990; 23: 100–106.

Komabayashi T, Nonomura G, Watanabe LG, Marshall GW Jr, Marshall SJ. Dentin tubule numerical density variations below the CEJ. *J Dent*. 2008 Nov;36(11):953-8.

Kurihara H, Kobayashi Y, Francisco AI, Isoshima O, Nagai A, Murayama Y. A microbiological and immunological study of endodontic-periodontic lesions. *J Endod*. 1995; 21: 617-621.

Kwon EY, Cho Y, Lee JY, Kim SJ, Choi J. Endodontic treatment enhances the regenerative potential of teeth with advanced periodontal disease with secondary endodontic involvement. *J Periodontal Implant Sci*. 2013; 43: 136–140.

Langeland K, Rodrigues H, Dowden W. Periodontal disease, bacteria, and pulpal histopathology. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1974; 37: 257–270.

Leonardo MR, Leal JM. *Endodontia: tratamento de canais radiculares.* São Paulo: Panamericana; 1998.

Li H, Guan R, Sun J, Hou B. Bacteria community study of combined periodontal endodontic lesions using denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing analysis. *J Periodontol.* 2014; 85: 1442-1449.

Lindhe J, Karring T, Lang NP, editores. *Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral.* 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999.

Lindskog S, Pierce AM, Blomlöf L. Chlorhexidine as a root canal medicament for treating inflammatory lesions in the periodontal space. *Endod Dent Traumatol.* 1998 Aug;14(4):186-190.

Liu CM, Shyu YC, Pei SC, Lan WH, Hou LT. In vitro effect of laser irradiation on cementum-bound endotoxin isolated from periodontally diseased roots. *J Periodontol.* 2002; (73)11: 1260-1266.

Lontelme RL, Handlemon SL, Herbrson RJ. Dentin formation in periodontally diseased teeth. *JDen: Res.*1976; 55: 48-51.

Lopes HP, Siqueira JF. *Endodontia biologia e técnica.* 4 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015

Love RM, Tanner ACR. Microbiology of dental caries and dentinal tubule infection. In: Fouad AF, editor. *Endodontic microbiology.* New York: Wiley-Blackwell. 2017; 25-49.

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

Mandel E, Machtou P, Torabinejad M. Clinical diagnosis and treatment of endodontic and periodontal lesions. *Quintessence Int.* 1993 Feb;24(2):135-9.

Mandi FA. Histological study of the pulp changes caused by periodontal disease. *J Br Endod Soc.* 1972; 6: 80–82.

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: 817-823.

Marinho AC. Investigação do conteúdo microbiológico e de endotoxinas e sua atividade antigênica em canais radiculares de dentes com pulpite irreversível e necrose pulpar na produção de citocinas pró-inflamatórias. Piracicaba, 2016. 110p. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.

Martin FE. Carious Pulpitis: Microbiological and histopathological considerations. *Aust Endod J.* 2003; 29: 134-137.

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

Martinho FC, Chiesa WM, Zaia AA, Ferraz CC, Almeida JF, Souza-Filho FJ, Gomes BP. Comparison of endotoxin levels in previous studies on primary endodontic infections. *J Endod* 2011; 37: 163–167.

Martinho FC, Chiesa WM, Zaia AA, Ferraz CC, Almeida JF, Souza-Filho FJ, Gomes BP. Comparison of endotoxin levels in previous studies on primary endodontic infections. *J Endod.* 2011 Feb;37(2):163-7.

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: 268–272.

Martinho FC, Gomes CC, Nascimento GG, Gomes APM, Leite FRM. Clinical comparison of the effectiveness of 7- and 14-day intracanal medications in root canal disinfection and inflammatory cytokines. *Clin Oral Investig*. 2018 Jan;22(1):523-530.

Martinho FC, Leite FR, Nascimento GG, Cirelli JA, Gomes BP. Clinical investigation of bacterial species and endotoxin in endodontic infection and evaluation of root canal content activity against macrophages by cytokine production. *Clin Oral Investig*. 2014; 18: 2095-2102.

Mazur B, Massler M. Influence of periodontal disease on the dental pulp. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1964; 17: 592–603.

Meng HX. Periodontic-endodontic lesions. [Review] *Ann Periodontol*. 1999; 4: 84-90.

Meyle J, Chapple I, Molecular aspects of the pathogenesis of periodontitis. *Periodontol*. 2000. 2015; 69:7-17.

Minabe M, Takeuchi K, Kumada H, Umemoto T. The effect of root conditioning with minocycline HCl in removing endotoxin from the roots of periodontally-involved teeth. *J Periodontol*. 1994 May;65(5):387-92.

Mjor, IA, Nordahl, I. The density and branching of dentinal tubules in human teeth. *Arch Oral Biol*. 1996; 41:401–412.

Moller GR. A fresh approach to controlled maintenance. *Hospitals*. 1966; 40: 71-73.

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

Muller CJ, Van Wyk CW. The amelo-cemental junction. *J Dent Assoc S Africa*, 1984; 39: 799-803.

Munson MA, Pitt-Ford T, Chong B, et al. Molecular and cultural analysis of the

microflora associated with endodontic infections. *J Dent Res.* 2002; 81: 761–766.

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

Nakabayashi N, Pashley D. *Hybridization of Dental Hard Tissues.* Quintessence Publishing:Tokyo; 1998.

Nakib NM, Bissada NF, Simmelink JW, Goldstine SN. Endotoxin penetration into root cementum of periodontally healthy and diseased human teeth. *J Periodontol.* 1982 Jun;53(6):368-78.

Neves FL, Silveira CA, Faig-Leite H. Anatomical study of palato-gingival groove in maxillary central incisors. *Brazilian Dental Science.* 2015;18: 59-67

Ng HM, Kin LX, Dashper SG, Slakeski N, Butler CA, Reynolds EC. Bacterial interactions in pathogenic subgingival plaque. *Microb Pathog.* 2016 May;94:60-9.

Nóbrega LM, Delboni MG, Martinho FC, Zaia AA, Ferraz CC, Gomes BP. *Treponema* diversity in root canals with endodontic failure. *Eur J Dent.* 2013; 7:61-8.

Nóbrega LM, Montagner F, Ribeiro AC, Mayer MA, Gomes BP. Bacterial diversity of symptomatic primary endodontic infection by clonal analysis. *Braz Oral Res.* 2016 Oct 10;30(1):e103.

Nyman S, Westfelt E, Sarhed G, Karring T. Role of "diseased" root cementum in healing following treatment of periodontal disease. A clinical study. *J Clin Periodontol.* 1988 Aug;15(7):464-8.

Oliveira LD, Carvalho CA, Carvalho AS, Alves JdeS, 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: 1053–1057.

Oliveira LD, Carvalho CAT, Valera MC, Koga-Ito CY, Jorge AOC. Diffusion ability of endotoxin through dentinal tubules. *Braz Oral Res.* 2005 Jan-Mar;19(1):5-10.

Osborn JW, Ten Cate AR. *Histologia dental avançada*. 4. ed. São Paulo: Quintessence, 1988.

Paul BF, Hutter JW. The endodontic-periodontal continuum revisited: New insights into etiology, diagnosis and treatment. *J Am Dent Assoc.* 1997; 128: 1541-1548.

Peeran SW, Thiruneervannan M, Abdalla KA, Muqrabi MH. Endo-perio lesions. *IJSTR.* 2013; 2: 268-274.

Petersson K, Söderström C, Kiani-Anaraki M, Lévy G. Evaluation of the ability of thermal and electrical tests to register pulp validity. *Endodontics & Dental Traumatology.* 1999; 15 Suppl 3: 127-131.

Petka KP. The sixteen deadly sins: a comprehensive approach to accuratediagnosis. *Dent Today.* 2000; 19: 56-61.

Pierce A. Pulpal injury: pathology, diagnosis and periodontal reaction. *Aust Endod J.* 1998; 24: 60-65.

Pradhan S, Goel K. Interrelationship between diabetes and periodontitis: a review. *JNMA J Nepal Med Assoc.* 2011 Jul-Sep;51(183):144-5.

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.

Ricucci D, Siqueira JF Jr. Fate of the tissue in lateral canals and apical ramifications in response to pathologic conditions and treatment procedures. *J Endod.* 2010 Jan;36(1):1-15.

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

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

Rosa TP, Signoretti FG, Montagner F, Gomes BP, Jacinto RC. Prevalence of *Treponema* spp. in endodontic retreatment-resistant periapical lesions. *Braz Oral Res.* 2015; 29.

Rotstein I, Friedman S, Mor C et al. Histological characterization of bleaching-induced external root resorption in dogs. *J Endod*, 1991; 17: 436-41a.

Rotstein I, Simon JH. The endo-perio lesion: A critical appraisal of the disease condition. *Endod Top.* 2006; 13: 34-56.

Rotstein I, Simon JHS. Diagnosis, prognosis and decision making in treatment of combined periodontal-endodontic lesions. *Periodontol 2000.* 2004; 34: 165-203.

Rotstein I, Torek Y, Misgav R. Effect of cementum defects on radicular penetration of 30% H₂O₂ during intracoronary bleaching. *J Endod*, 1991; 17: 230-3b.

Rotstein I. Interaction between endodontics and periodontics. *Periodontol 2000.* 2017 Jun;74(1):11-39.

Rovai ES. Estudo da diversidade microbiana e níveis de endotoxinas em lesões endo-periodontais. São José dos Campos, 2014. 88p. Tese (Mestrado) - Univ Estadual Paulista.

Rubach WC, Mitchell, DF. Periodontal disease, accessory canals and pulp pathosis. *J Periodontol.* 1965; 36: 34-38.

Rupf S, Kannengiesser S, Merte K, Pfister W, Sigusch B, Eschrich K. Comparison of profiles of key periodontal pathogens in periodontium and endodontium. *Endod Dent*

Traumatol. 2000; 16: 269-275.

Ryu YH, Baik JE, Yang JS, Kang SS, Im J, Yun CH, Kim DW, Lee K, Chung DK, Ju HR, Han SH. Differential immunostimulatory effects of Gram-positive bacteria due to their lipoteichoic acids. *Int Immunopharmacol*. 2009 Jan;9(1):127-33.

Sakamoto M, Rôças IN, Siqueira JF Jr, Benno Y. Molecular analysis of bacteria in asymptomatic and symptomatic endodontic infections. *Oral Microbiol Immunol* 2006; 21: 112–122.

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

Schroeder HE, Scherle WF. Cemento-enamel junction revisited. *J Periodontal Res*, 1988; 23: 53-9.

Sedgley CM, Molander A, Flannagan SE, Nagel AC, Appelbe OK, Clewell DB, Dahlén G. Virulence, phenotype and genotype characteristics of endodontic *Enterococcus* spp. *Oral Microbiol Immunol*. 2005; 20: 10-19.

Seltzer S, Bender IB, Nazimov H, Sinai I. Pulpitis-Induced Inter-radicular Periodontal Changes in Experimental Animals. *J Periodontol*. 1967;38: 124-129.

Seltzer S, Bender IB, Ziontz M. The interrelationship of pulp and periodontal disease. *Oral Surg*. 1963; 16: 1474-1490.

Seltzer S, Bender IB. Inflammation in the odontoblastic layer of the dental pulp. *J Am Dent Assoc*. 1959; 59, 720–772.

Seltzer S, Farber PA. Microbiologic factors in endodontology. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1994; 78: 634-645.

Simon JHS, Glick DH, Frank AL. The relationship of endodontic-periodontic lesions. *J*

Periodontol. 1972; 43: 202-208.

Simring M, Goldberg. The Pulpal Pocket Approach: Retrograde Periodontitis. J. Periodontol. 1964; 35: 1-22.

Sinai I, Soltanoff W. The transmission of pathologic changes between the pulp and the periodontal structures. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1973; 36:558.

Siqueira JF Jr, Lopes H P. Microbiologia endodôntica. In: Siqueira Jr. JF, Lopes HP. Endodontia. Biologia e Técnica. Rio de Janeiro: Medsi, 1999. 650 p.

Siqueira JF Jr, Rôças IN, Souto R, de Uzeda M, Colombo AP. *Checkerboard* DNA-DNA hybridization analysis of endodontic infections. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2000 Jun; 89(6):744-8.

Siqueira JF Jr, Rôças IN, Souto R, Uzeda M, Colombo AP. Microbiological evaluation of acute periradicular abscesses by DNA-DNA hybridization. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2001; 92: 451-457.

Siqueira JF Jr, Rôças IN. Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 2-Redefining the endodontic microbiota. J Endod. 2005; 31: 488-498b.

Siqueira JF Jr, Rôças IN. Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 1--current molecular technologies for microbiological diagnosis. J Endod. 2005; 31: 411-423a.

Siqueira Jr JF, Rôças IN. Bacterial Pathogenesis and Mediators in Apical Periodontitis. Braz Dent J 2007; 18: 267-280.

Siqueira Jr JF, Rôças IN. Detection of Filifactor alocis in endodontic infections associated with different forms of periradicular diseases. Oral Microbiol Immunol. 2003; 18: 263-5.

Socransky SS, Haffajee AD, Smith C, Martin L, Haffajee JA, Uzel NG, Goodson JM. Use of *Checkerboard* DNA-DNA hybridization to study complex microbial ecosystems. *Oral Microbiol Immunol* 2004; 19: 352-362.

Socransky SS¹, Smith C, Martin L, Paster BJ, Dewhirst FE, Levin AE. *Checkerboard DNA-DNA hybridization*. *Biotechniques* 1994, 17: 788-792.

Solomon C, Chalfin H, Kellert M, Weseley P. The endodontic-periodontal lesion: a rational approach to treatment. *J Am Dent Assoc.* 1995; 126: 473-479.

Stahl SS: Pathogenesis of inflammatory lesions in pulp and periodontal tissues. *Periodontics*.1966;4:190.

Stallard RE. Periodontic-endodontic relationships. *Oral Surg.* 1972; 34: 314-326.

Stashenko P, Jandinski JJ, Fujiyoshi P, Rynar J, Socransky SS. Tissue levels of bone resorptive cytokines in periodontal disease. *J Periodontol.* 1991; 62: 504-509.

Subramanian K, Mickel AK. Molecular analysis of persistent periradicular lesions and root ends reveals a diverse microbial profile. *J Endod.* 2009; 35: 950-957.

Tanomaru Filho M, Leonardo MR, da Silva LA. Effect of irrigating solution and calcium hydroxide root canal dressing on the repair of apical and periapical tissues of teeth with periapical lesion. *J Endod.* 2002 Apr;28(4):295-9.

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 Nov;36(11):733-9.

Ten Cate AR. *Oral histology - development, structure and function*. St. Louis: Mosby Year Book, 1994.

Toledo BEC, Rosetti EP. Lesões endo-periodontais combinadas. In: Leonardo MR.

Endodontia: tratamento de canais radiculares: princípios técnicos e biológicos. Ed. São Paulo: Artes Médicas, 2005.

Torabinejad M, Kiger RD. A histologic evaluation of dental pulp tissue of a patient with periodontal disease. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1985; 59:198-200.

Touyz LZ. Periodontitis contributes to initiation, progress and aggravation of septic shock; a feasible hypothesis. *Med Hypotheses.* 2013 Oct;81(4):650-2.

variations below the CEJ. *J Dent.* 2008; 36:953–958.

Vianna ME, Horz HP, Conrads G, Feres M, Gomes BP. Comparative analysis of endodontic pathogens using *Checkerboard* hybridization in relation to culture. *Oral Microbiol Immunol.* 2008; 23: 282-290.

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: 411-418.

Vieira Colombo AP, Magalhães CB, Hartenbach FA, Martins do Souto R, Maciel da Silva-Boghossian C. Periodontal-disease-associated biofilm: A reservoir for pathogens of medical importance. *Microb Pathog.* 2016 May;94:27-34.

Von Troil B, Needleman I, Sanz M. A systematic review of the prevalence of root sensitivity following periodontal therapy. *J Clin Periodontol.* 2002; 3: 173-177.

Wakisaka S. Neuropeptides in the dental pulp: distribution, origins and correlation. *J Endod* 1990; 16: 67–69.

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

Wang HL, Glickman GN. Endodontic and Periodontic Interrelationships. In: Cohen S, Burns RC, editors. *Pathways of the pulp.* 8. ed: Mosby; 2002. p. 651-664.

Wang JE, Dahle MK, McDonald M, Foster SJ, Aasen AO, Thiemermann C. Peptidoglycan and lipoteichoic acid in Gram-positive bacterial sepsis: receptors, signal transduction, biological effects, and synergism. *Shock* 2003; 20: 402-414.

Whyman RA. Endodontic-periodontic lesion. I. Prevalence, etiology, and diagnosis. *N Z Dent J*. 1988;84:74.

Willis SG, Smith KS, Dunn VL, Gapter LA, Riviere KH, Riviere GR. Identification of seven *Treponema* species in health and disease-associated dental plaque by Nested PCR. *J Clin Microbiol*. 1999; 37: 867-869.

Wilson M, Reddi K, Henderson B. Cytokine-inducing components of periodontopathogenic bacteria. *J Periodontal Res*. 1996 Aug;31(6):393-407.

Zehnder M, Gold SI, Hasselgren G. Pathologic interactions in pulpal and periodontal tissues. *J Clin Periodontol* 2002; 29: 663-671.

Zehnder M. Endodontic infection caused by localized aggressive periodontitis: A case report and bacteriologic evaluation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2001; 92: 440-445.

APÊNDICES

Apêndice 1. Ficha clínica para coleta de informações dos pacientes envolvidos na pesquisa.

FICHA CLÍNICA									
NOME:						NASC.:			
R.G.:				C.P.F.:				SEXO:	
ENDEREÇO:									
BAIRRO:				CEP			CIDADE		
TEL. RES.:					PROFISSÃO:				
TEL. CEL:					TEL.COM.:				
RESPONSÁVEL (MENORES 18):						PARENTESCO:			
		SEM / NÃO		ESPECIFICAÇÕES					
ESTÁ SOB CUIDADOS MÉDICOS				QUAL(IS)?					
TOMA ALGUM MEDICAMENTO				QUAL(IS)?					
JÁ SOFREU CIRURGIAS/EXTRAÇÕES				QUAL(IS)?					
JÁ FOI ANESTESIADO(A)				HOVERAM PROBLEMAS?					
SOPRE(U) DE DOENÇA SEVERA				QUAL(IS)?					
TEM ALERGIA / ASMA				A QUE?					
TEM PROBLEMAS CARDÍACOS				QUAL(IS)?					
USA MARCAPASSO				DESDE?					
TEM PRESSÃO ALTA				CONTROLADA?					
TEM DIABETES				TIPO:				DESDE:	
JÁ TEVE HEPATITE				TIPO:					
É PORTADOR DO VÍRUS HIV				DESDE:					
FUMA REGULARMENTE				O QUE?	FREQUÊNCIA		DESDE		
CONSUME BEBIDAS ALCOÓLICAS				QUAIS?		FREQUÊNCIA			
USA ALGUM TIPO DE DROGA (MESMO QUE OCASIONALMENTE)				QUAL?	FREQUÊNCIA				
POSSUI FAMILIARES DOENTES				QUÊM E QUAIS?					
FAZ REGIME ALIMENTAR				QUAL?				DESDE:	
SANGRA MUITO AO SE FERIR									
RANGE OS DENTES				DURANTE O DIA OU À NOITE?					
MULHERES	ESTÁ GRÁVIDA				MÊS:				
	USA ANTICONCEPCIONAIS				QUAL?				DESDE:
CONSUME QUEIJO				QUAL?					
TEMPO DO TRATAMENTO ANTERIOR									

Apêndice 1. Ficha clínica para coleta de informações dos pacientes envolvidos na pesquisa (continuação).

ELEMENTO DENTAL:				
EXAME SUBJETIVO				
A - DOR PROVOCADA:			B - DOR ESPONTÂNEA	
() INTERMITENTE	() CONTÍNUA	() CESSA COM ANALGÉSICO	() _____	
EXAME OBJETIVO				
1 - INSPEÇÃO	() HÍGIDO	() RESTAURADO	() PRÓTESE	() EXPOSIÇÃO
() CÁRIE	() EDEMA	() FÍSTULA	() _____	
2 - PERCUSSÃO	(.....) VERTICAL		(.....) HORIZONTAL	
	() AUSÊNCIA	() SENSIBILIDADE	() DOR	
3 - FRIO	() INDOLOR	() SENSÍVEL	() DOR	() CESSA RÁPIDO
			() PROLONGADA	
4 - PALPAÇÃO	() INDOLOR	() SENSIBILIDADE	() DOR	() EDEMA
5 - EXAME PERIODONTAL	() RETRAÇÃO	___ FACE ___	() FURCA GRAU	___ / FACE ___
() BOLSA	___ MM/ FACE ___	___ MM/ FACE ___	___ MM/ FACE ___	___ MM/ FACE ___
EXAMES COMPLEMENTARES				
1 - EXAME RADIOGRÁFICO	() LESÃO PERIAPICAL	() ESPESSEAMENTO PERIODONTAL		
() CÁRIE	() PERDA DA LÂMINA DURA	() _____	() _____	
DIAGNÓSTICO				
() POLPA NORMAL	() PULPITE REVERSÍVEL	() PULPITE IRREVERSÍVEL	() NECROSE	
() PERICEMENTITE	() ABSCESSO _____	() OUTRO _____		
TRATAMENTO PROPOSTO				
() TRATAM. ENDODÔNTICO	() TRATAM. CONSERVADOR	() TRATAM. RESTAURADOR		
() RETRATAMENTO	() APICIGENESE / APICIFICAÇÃO	() _____		

**COLETAS
REALIZADAS**

SULCO GINGIVAL: ()
ETX / CTX
VMGA
IE

DATA: ___ / ___ / ___ ASS: _____

Apêndice 2. Dados clínicos dos 10 dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário.

Casos	Sexo	Idade	Dente	Condição periodontal		Aspecto da coroa clínica		Condição pulpar / periapical		
				Bolsa (mm)	Mobilidade (grau)	Restaurado	Hígido	Dor espontânea	Dor à palpação	Sensibilidade à percussão
1	M	40	16	12	1	0	1	0	0	0
2	F	15	46	10	1	0	1	0	0	0
3	M	53	24	7	1	0	1	0	0	0
4	M	53	25	9	1	0	1	0	0	0
5	F	16	22	10	1	0	1	0	0	0
6	F	16	21	8	1	0	1	0	0	0

7	F	16	11	8	1	0	1	0	0	0
8	F	16	12	11	1	0	1	0	0	0
9	F	42	21	8	2	0	1	0	0	0
10	M	38	21	7	2	0	1	0	0	0

Apêndice 3. Prevalência de *Treponema denticola* encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo Nested PCR.

<i>Treponema denticola</i>						
Casos	CP1	CP2	CP3	CE1	CE2	CE3
1	1	1	1	0	0	0
2	1	1	1	0	0	0
3	0	0	1	0	0	0
4	1	1	1	0	0	0
5	1	1	1	0	0	0
6	1	0	1	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0
8	1	0	0	0	0	0
9	1	1	0	0	0	0
10	1	1	1	0	0	0

Apêndice 4. Prevalência de *Treponema socransky* encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo Nested PCR.

Treponema socransky

Casos	CP1	CP2	CP3	CE1	CE2	CE3
1	0	1	0	0	0	0
2	0	1	1	0	0	0
3	1	1	0	0	0	0
4	1	0	1	0	0	0
5	1	1	1	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0
8	1	0	1	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0
10	1	1	1	0	0	0

Apêndice 5. Prevalência de *Gemella morbillorum* encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo Nested PCR.

<i>Gemella morbillorum</i>						
Casos	CP1	CP2	CP3	CE1	CE2	CE3
1	1	1	0	0	0	0
2	1	1	0	0	0	0
3	1	1	0	0	0	0
4	1	0	1	0	0	0
5	1	1	1	0	0	0
6	0	0	1	0	0	0
7	1	0	0	0	0	0
8	1	0	1	0	0	0
9	1	1	0	0	0	0
10	1	1	1	0	0	0

Apêndice 6. Prevalência de *Tannerella forsythia* encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo Nested PCR.

<i>Tannerella forsythia</i>						
Casos	CP1	CP2	CP3	CE1	CE2	CE3
1	1	1	1	0	0	0
2	1	1	1	0	0	1
3	1	1	0	0	0	0
4	1	1	1	1	0	0
5	1	1	1	0	0	0
6	1	1	0	0	0	0
7	1	1	0	0	0	0
8	1	1	0	0	0	0
9	1	1	0	1	0	0
10	1	1	1	1	0	0

Apêndice 7. Prevalência de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo Nested PCR.

<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>						
Casos	CP1	CP2	CP3	CE1	CE2	CE3
1	1	0	1	0	0	0
2	0	1	0	0	0	0
3	1	1	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
5	1	1	1	1	1	0
6	1	1	1	0	0	1
7	1	1	1	0	0	0
8	1	1	1	0	0	0
9	1	1	0	1	0	0
10	1	0	1	1	1	0

Apêndice 8. Prevalência de *Porphyromonas endodontalis* encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo Nested PCR.

<i>Porphyromonas endodontalis</i>						
Casos	CP1	CP2	CP3	CE1	CE2	CE3
1	1	1	1	0	0	0
2	1	1	1	0	0	1
3	1	1	1	0	0	0
4	1	0	1	1	0	0
5	1	1	1	0	0	0
6	1	1	1	0	0	1
7	1	0	0	0	0	0
8	1	0	1	0	0	0
9	1	1	0	0	0	0
10	1	1	1	1	1	0

Apêndice 9. Prevalência de *Porphyromonas gingivalis* encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo Nested PCR.

<i>Porphyromonas gingivalis</i>						
Casos	CP1	CP2	CP3	CE1	CE2	CE3
1	1	1	1	1	0	1
2	1	1	1	0	1	1
3	1	1	1	0	1	1
4	1	1	1	1	1	1
5	1	1	1	1	1	1
6	1	1	1	1	0	1
7	1	1	1	1	1	0
8	1	1	1	1	1	1
9	1	1	1	1	0	0
10	1	1	1	1	1	1

Apêndice 10. Prevalência de *Prevotella intermedia* encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo Nested PCR.

Prevotella intermedia

Casos	CP1	CP2	CP3	CE1	CE2	CE3
1	1	1	0	0	0	0
2	1	1	0	0	0	0
3	1	0	0	0	0	0
4	1	0	0	0	0	0
5	1	1	1	0	0	0
6	0	0	1	0	0	0
7	1	1	1	0	0	0
8	1	0	0	0	0	0
9	1	1	0	0	0	0
10	1	1	1	0	0	0

Apêndice 11. Prevalência de *Prevotella tannerae* encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo Nested PCR.

<i>Prevotella tannerae</i>						
Casos	CP1	CP2	CP3	CE1	CE2	CE3
1	0	0	0	1	1	0
2	1	1	1	0	0	0
3	0	0	0	1	0	0
4	1	1	1	1	1	1
5	0	0	0	0	0	0
6	1	0	1	1	1	0
7	1	1	1	1	1	1
8	0	0	1	1	0	0
9	1	1	1	1	1	1
10	1	1	1	1	0	0

Apêndice 12. Prevalência de *Prevotella nigrescens* encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo Nested PCR.

<i>Prevotella nigrescens</i>						
Casos	CP1	CP2	CP3	CE1	CE2	CE3
1	1	1	1	0	0	0
2	1	1	1	0	0	0
3	1	1	0	0	0	0
4	1	0	1	1	0	0
5	1	1	1	1	0	1
6	1	1	1	0	0	1
7	1	1	1	1	1	0
8	1	0	1	0	0	0
9	1	1	0	0	0	0
10	1	1	1	1	1	0

Apêndice 13. Prevalência de *Filifactor alocis* encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo Nested PCR.

<i>Filifactor alocis</i>						
Casos	CP1	CP2	CP3	CE1	CE2	CE3
1	1	1	1	1	0	0
2	1	1	1	0	0	1
3	1	1	1	0	0	0
4	1	0	1	0	0	0
5	1	1	1	0	0	0
6	0	0	1	0	0	1
7	1	1	0	0	0	0
8	1	0	1	0	0	0
9	1	1	1	1	0	1
10	1	1	1	1	0	0

Apêndice 14. Prevalência de *Fusobacterium nucleatum* encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo Nested PCR.

<i>Fusobacterium nucleatum</i>						
Casos	CP1	CP2	CP3	CE1	CE2	CE3
1	1	1	1	1	1	0
2	1	1	1	1	1	0
3	1	1	1	1	1	1
4	1	1	1	1	0	1
5	1	1	1	1	1	1
6	1	1	1	1	1	1
7	1	1	1	1	1	1
8	1	1	1	1	1	1
9	1	1	1	1	0	0
10	1	1	1	1	1	1

Apêndice 15. Prevalência de *Parvimonas micra* encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo Nested PCR.

<i>Parvimonas micra</i>						
Casos	CP1	CP2	CP3	CE1	CE2	CE3
1	1	1	1	0	0	0
2	1	1	1	0	0	0
3	1	1	1	0	0	0
4	1	0	0	0	0	0
5	1	1	1	0	0	0
6	1	0	0	0	0	0
7	1	1	1	0	0	0
8	0	1	0	0	0	0
9	0	1	1	0	0	0
10	1	1	1	0	0	0

Apêndice 16. Prevalência de *Actinomyces naeslundii* encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo Nested PCR.

<i>Actinomyces naeslundii</i>						
Casos	CP1	CP2	CP3	CE1	CE2	CE3
1	1	1	1	0	0	0
2	1	1	1	0	0	0
3	1	1	0	0	0	0
4	1	0	1	1	0	0
5	1	1	1	1	0	0
6	0	0	1	0	0	0
7	1	1	0	0	0	0
8	1	0	1	0	0	0
9	1	1	0	0	0	0
10	1	1	1	0	0	0

Apêndice 17. Prevalência de *Dialister pneumosintes* encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo Nested PCR.

<i>Dialister pneumosintes</i>						
Casos	CP1	CP2	CP3	CE1	CE2	CE3
1	1	1	1	0	0	0
2	1	1	1	0	0	0
3	1	1	0	0	0	0
4	1	0	1	0	0	0
5	1	1	1	0	0	0
6	0	0	1	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0
8	1	0	1	0	0	0
9	1	1	0	0	0	0
10	1	1	1	0	0	0

Apêndice 18. Prevalência de *Enterococcus faecalis* encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo Nested PCR.

<i>Enterococcus faecalis</i>						
Casos	CP1	CP2	CP3	CE1	CE2	CE3
1	1	1	1	1	1	1
2	1	1	1	1	1	1
3	1	1	1	1	0	0
4	1	1	1	1	1	1
5	1	1	1	1	1	1
6	1	1	1	1	1	0
7	1	1	1	1	1	0
8	1	1	1	1	1	1
9	1	1	1	1	1	0
10	1	1	1	1	1	1

Apêndice 19. Prevalência de *Streptococcus sobrinus* encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo Nested PCR.

Streptococcus sobrinus

Casos	CP1	CP2	CP3	CE1	CE2	CE3
1	1	0	0	0	0	0
2	0	1	0	0	0	0
3	0	1	0	0	0	0
4	1	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0
7	1	0	0	0	0	0
8	0	1	0	0	0	0
9	1	1	1	1	0	0
10	0	0	0	0	0	0

Apêndice 20. Detecção de *Enterococcus hirae* encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo *Checkerboard DNA-DNA hybridization*.

<i>Enterococcus hirae</i>						
Casos	CP1	CP2	CP3	CE1	CE2	CE3
1	2	0	0	2	0	0
2	2	0	0	0	0	0
3	0	0	0	1	0	0
4	0	0	0	1	0	0
5	0	0	0	1	0	0
6	2	0	0	1	0	0
7	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	1	0	0
9	1	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0

Apêndice 21. Detecção de *Enterococcus faecium* encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo *Checkerboard DNA-DNA hybridization*.

<i>Enterococcus faecium</i>						
Casos	CP1	CP2	CP3	CE1	CE2	CE3
1	2	0	0	0	0	0
2	2	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	1	0	0
8	0	0	0	0	0	0
9	0	0	1	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0

Apêndice 22. Detecção de *Eubacterium nodatum* encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo *Checkerboard DNA-DNA hybridization*.

<i>Eubacterium nodatum</i>						
Casos	CP1	CP2	CP3	CE1	CE2	CE3
1	3	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	2
10	0	0	0	0	0	2

Apêndice 23. Detecção de *Porphyromonas gingivalis* encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo *Checkerboard DNA-DNA hybridization*.

<i>Porphyromonas gingivalis</i>						
Casos	CP1	CP2	CP3	CE1	CE2	CE3
1	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
5	0	0	2	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0
9	0	0	3	1	0	1
10	0	0	0	0	1	1

Apêndice 24. Detecção de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo *Checkerboard DNA-DNA hybridization*.

<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>						
Casos	CP1	CP2	CP3	CE1	CE2	CE3
1	1	0	0	0	0	0
2	1	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
5	0	0	2	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	1	0	2
10	0	0	0	0	0	1

Apêndice 25. Detecção de *Fusobacterium nucleatum* (sp. *vincentii*) encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo *Checkerboard DNA-DNA hybridization*.

<i>Fusobacterium nucleatum</i> (sp. <i>vincentii</i>)						
Casos	CP1	CP2	CP3	CE1	CE2	CE3
1	1	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	2
10	0	0	0	0	0	0

Apêndice 26. Detecção de *Campylobacter rectus* encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo *Checkerboard DNA-DNA hybridization*.

Campylobacter rectus

Casos	CP1	CP2	CP3	CE1	CE2	CE3
1	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	1

Apêndice 27. Detecção de *Treponema socransky* encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo *Checkerboard DNA-DNA hybridization*.

<i>Treponema socransky</i>						
Casos	CP1	CP2	CP3	CE1	CE2	CE3
1	1	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0
9	0	0	1	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0

Apêndice 28. Detecção de *Eubacterium saburreum* encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo *Checkerboard DNA-DNA hybridization*.

<i>Eubacterium saburreum</i>						
Casos	CP1	CP2	CP3	CE1	CE2	CE3
1	1	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	2
7	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0

Apêndice 29. Detecção de *Parvimonas micra* encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo *Checkerboard DNA-DNA hybridization*.

<i>Parvimonas micra</i>						
Casos	CP1	CP2	CP3	CE1	CE2	CE3
1	3	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0
6	2	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0
8	0	0	1	0	0	0
9	0	0	3	0	0	0
10	2	0	2	0	0	0

Apêndice 30. Detecção de *Veillonella parvula* encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo *Checkerboard DNA-DNA hybridization*.

<i>Veillonella parvula</i>						
Casos	CP1	CP2	CP3	CE1	CE2	CE3
1	2	0	0	0	0	0
2	2	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
5	0	0	1	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0
10	0	0	1	0	0	0

Apêndice 31. Detecção de *Actinomyces oris* encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo *Checkerboard DNA-DNA hybridization*.

<i>Actinomyces oris</i>						
Casos	CP1	CP2	CP3	CE1	CE2	CE3
1	1	0	0	0	0	0
2	1	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0
6	1	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0
10	0	0	1	0	0	0

Apêndice 32. Detecção de *Enterococcus faecalis* encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo *Checkerboard DNA-DNA hybridization*.

<i>Enterococcus faecalis</i>						
Casos	CP1	CP2	CP3	CE1	CE2	CE3
1	2	0	0	0	0	0
2	1	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	1	0
4	0	0	0	0	1	0
5	0	0	0	0	0	0
6	2	0	0	0	0	0
7	0	0	0	1	0	0
8	0	0	0	1	0	0
9	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	1	0	0

Apêndice 33. Detecção de *Dialister pneumosintes* encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo *Checkerboard DNA-DNA hybridization*.

<i>Dialister pneumosintes</i>						
Casos	CP1	CP2	CP3	CE1	CE2	CE3
1	1	0	0	0	0	0
2	1	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
5	0	0	3	0	0	0
6	1	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0

Apêndice 34. Detecção de *Porphyromonas endodontalis* encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo *Checkerboard DNA-DNA hybridization*.

<i>Porphyromonas endodontalis</i>						
Casos	CP1	CP2	CP3	CE1	CE2	CE3
1	1	0	0	0	0	0
2	1	0	1	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
5	0	0	3	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	1
10	0	0	0	0	0	1

Apêndice 35. Detecção de *Streptococcus oralis* encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo *Checkerboard DNA-DNA hybridization*.

<i>Streptococcus oralis</i>						
Casos	CP1	CP2	CP3	CE1	CE2	CE3
1	0	0	0	0	0	0
2	1	0	2	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
5	0	0	3	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0
9	0	2	0	0	0	0
10	1	0	0	0	0	0

Apêndice 36. Detecção de *Capnocytophaga ochracea* encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo *Checkerboard DNA-DNA hybridization*.

<i>Capnocytophaga ochracea</i>						
Casos	CP1	CP2	CP3	CE1	CE2	CE3
1	1	0	0	1	0	0
2	1	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	1	0
4	0	0	1	1	1	0
5	0	0	3	0	0	0
6	2	0	0	1	0	0
7	0	0	0	1	0	0
8	0	0	0	1	0	0
9	1	2	0	0	0	1
10	1	3	0	0	0	0

Apêndice 37. Detecção de *Actinomyces israelii* encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo *Checkerboard DNA-DNA hybridization*.

<i>Actinomyces israelii</i>						
Casos	CP1	CP2	CP3	CE1	CE2	CE3
1	1	0	0	0	0	0
2	1	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	1	0	0
5	0	0	1	0	0	0
6	1	0	0	0	0	1
7	0	0	0	0	0	1
8	0	0	0	0	0	0
9	0	1	0	0	0	1
10	0	0	0	0	0	0

Apêndice 38. Detecção de *Streptococcus intermedius* encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo *Checkerboard DNA-DNA hybridization*.

<i>Streptococcus intermedius</i>						
Casos	CP1	CP2	CP3	CE1	CE2	CE3
1	1	0	2	0	0	0
2	1	0	2	0	0	0
3	0	0	1	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
5	0	0	1	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0
9	0	3	0	1	0	1
10	1	2	0	0	0	1

Apêndice 39. Detecção de *Treponema denticola* encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo *Checkerboard DNA-DNA hybridization*.

Treponema denticola

Casos	CP1	CP2	CP3	CE1	CE2	CE3
1	2	0	0	0	0	0
2	1	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0

Apêndice 40. Detecção de *Prevotella nigrescens* encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo *Checkerboard DNA-DNA hybridization*.

<i>Prevotella nigrescens</i>						
Casos	CP1	CP2	CP3	CE1	CE2	CE3
1	1	0	0	0	0	0
2	1	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0
6	1	2	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	1
8	0	0	0	0	0	0
9	0	2	0	0	0	0
10	0	2	0	0	0	0

Apêndice 41. Detecção de *Actinomyces odontolyticus* encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo *Checkerboard DNA-DNA hybridization*.

<i>Actinomyces odontolyticus</i>						
Casos	CP1	CP2	CP3	CE1	CE2	CE3
1	1	0	0	0	0	0
2	1	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0
6	1	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0
9	0	2	0	0	0	0
10	3	3	0	0	0	0

Apêndice 42. Detecção de *Fusobacterium nucleatum* (sp. *polymorphum*) encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo *Checkerboard DNA-DNA hybridization*.

Fusobacterium nucleatum (sp. *polymorphum*)

Casos	CP1	CP2	CP3	CE1	CE2	CE3
1	2	0	0	0	0	0
2	2	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	1	0
5	0	0	0	0	0	0
6	2	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0
9	0	2	0	0	0	2
10	0	1	0	0	0	0

Apêndice 43. Detecção de *Campylobacter Showae* encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo *Checkerboard DNA-DNA hybridization*.

<i>Campylobacter Showae</i>						
Casos	CP1	CP2	CP3	CE1	CE2	CE3
1	1	0	0	0	0	0
2	1	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	1	0
4	0	0	0	0	1	0
5	0	0	0	0	0	0
6	1	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0
9	0	1	0	0	0	0
10	0	2	0	0	0	0

Apêndice 44. Detecção de *Fusobacterium periodonticum* encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo *Checkerboard DNA-DNA hybridization*.

<i>Fusobacterium periodonticum</i>						
Casos	CP1	CP2	CP3	CE1	CE2	CE3
1	1	0	0	0	0	0
2	1	0	0	0	0	0
3	1	0	0	0	1	0
4	0	0	0	0	0	0
5	1	0	0	0	0	0
6	1	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0
8	1	0	0	0	0	0
9	0	2	0	0	0	0
10	0	1	0	0	0	0

Apêndice 45. Detecção de *Neisseria mucosa* encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo *Checkerboard DNA-DNA hybridization*.

<i>Neisseria mucosa</i>						
Casos	CP1	CP2	CP3	CE1	CE2	CE3
1	0	0	0	0	0	0
2	1	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	1
7	0	0	0	0	0	2
8	0	0	0	0	0	0
9	0	1	0	0	0	0
10	0	2	0	0	0	0

Apêndice 46. Detecção de *Fusobacterium nucleatum* encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo *Checkerboard DNA-DNA hybridization*.

<i>Fusobacterium nucleatum</i>						
Casos	CP1	CP2	CP3	CE1	CE2	CE3
1	4	0	0	3	0	0
2	2	0	0	1	0	2
3	0	0	0	2	1	1
4	0	0	0	2	1	0
5	0	0	0	2	0	2
6	2	0	0	1	0	2
7	0	0	0	1	0	2
8	0	0	0	0	0	0
9	1	2	0	0	0	0
10	0	2	0	1	0	0

Apêndice 47. Detecção de *Capnocytophaga gingivalis* encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo *Checkerboard DNA-DNA hybridization*.

<i>Capnocytophaga gingivalis</i>						
Casos	CP1	CP2	CP3	CE1	CE2	CE3
1	1	0	0	0	0	0
2	1	0	2	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0
9	0	2	0	0	0	0
10	1	2	0	0	0	0

Apêndice 48. Detecção de *Streptococcus gordonii* encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo *Checkerboard DNA-DNA hybridization*.

<i>Streptococcus gordonii</i>						
Casos	CP1	CP2	CP3	CE1	CE2	CE3
1	1	0	0	1	0	0
2	1	0	2	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	1	0	0
6	1	0	0	1	0	0
7	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0
9	0	2	0	0	0	2
10	2	2	0	0	0	0

Apêndice 49. Detecção de *Tannerella forsythia* encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo *Checkerboard DNA-DNA hybridization*.

<i>Tannerella forsythia</i>						
Casos	CP1	CP2	CP3	CE1	CE2	CE3
1	3	0	0	0	0	0
2	1	0	3	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0
6	1	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0
9	0	2	0	2	0	0
10	1	3	0	1	0	0

Apêndice 50. Detecção de *Staphylococcus epidermidis* encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo *Checkerboard DNA-DNA hybridization*.

<i>Staphylococcus epidermidis</i>						
Casos	CP1	CP2	CP3	CE1	CE2	CE3
1	3	0	0	0	0	0
2	2	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	1	0
4	0	0	0	2	2	0
5	0	0	0	1	0	0
6	2	0	0	1	0	0
7	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0

Apêndice 51. Detecção de *Propionibacterium acnes* encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo *Checkerboard DNA-DNA hybridization*.

<i>Propionibacterium acnes</i>						
Casos	CP1	CP2	CP3	CE1	CE2	CE3
1	0	0	0	0	0	0
2	0	0	2	0	0	0
3	0	0	1	0	0	0
4	0	0	1	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0
6	0	1	2	0	0	0
7	0	0	2	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0
9	0	1	0	0	0	1
10	2	0	0	0	0	1

Apêndice 52. Detecção de *Prevotella melaninogenica* encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo *Checkerboard DNA-DNA hybridization*.

Prevotella melaninogenica

Casos	CP1	CP2	CP3	CE1	CE2	CE3
1	2	0	0	0	0	0
2	1	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0

Apêndice 53. Detecção de *Streptococcus mitis* encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo *Checkerboard DNA-DNA hybridization*.

<i>Streptococcus mitis</i>						
Casos	CP1	CP2	CP3	CE1	CE2	CE3
1	2	0	0	0	0	0
2	1	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0
6	1	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	2

Apêndice 54. Detecção de *Eikenella corrodens* encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo *Checkerboard DNA-DNA hybridization*.

Eikenella corrodens

Casos	CP1	CP2	CP3	CE1	CE2	CE3
1	1	0	0	0	0	0
2	1	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0

Apêndice 55. Detecção de *Gemella morbillorum* encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo *Checkerboard DNA-DNA hybridization*.

Gemella morbillorum

Casos	CP1	CP2	CP3	CE1	CE2	CE3
1	3	0	0	0	0	0
2	2	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0

Apêndice 56. Detecção de *Capnocytophaga sputigena* encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo *Checkerboard DNA-DNA hybridization*.

Capnocytophaga sputigena

Casos	CP1	CP2	CP3	CE1	CE2	CE3
1	1	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0

Apêndice 57. Detecção de *Filifactor alocis* encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo *Checkerboard DNA-DNA hybridization*.

<i>Filifactor alocis</i>						
Casos	CP1	CP2	CP3	CE1	CE2	CE3
1	2	0	0	0	0	0
2	2	0	2	0	0	0
3	0	0	2	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0
9	0	2	0	0	0	3
10	0	1	0	0	0	3

Apêndice 58. Detecção de *Streptococcus mutans* encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo *Checkerboard DNA-DNA hybridization*.

<i>Streptococcus mutans</i>						
Casos	CP1	CP2	CP3	CE1	CE2	CE3
1	3	0	0	0	0	0
2	2	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0
8	0	0	1	0	0	0
9	0	0	1	0	0	0
10	0	1	1	0	0	0

Apêndice 59. Detecção de *Prevotella intermedia* encontradas nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo *Checkerboard DNA-DNA hybridization*.

<i>Prevotella intermedia</i>						
Casos	CP1	CP2	CP3	CE1	CE2	CE3
1	2	0	0	0	0	0
2	1	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0
8	0	0	2	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0

Apêndice 60. Níveis de endotoxinas detectados nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário pelo método LAL pyrogen 5000.

Caso	CP1	CP2	CP3	CE1	CE2	CE3
1	363,0	158,5	81,6	0,1	0,10	0,01
2	153,0	100,0	45,5	0,1	0,10	0,01
3	181,0	113,0	164,0	0,1	0,10	0,01
4	180,0	107,0	16,6	0,1	0,01	0,01
5	168,6	116,0	24,0	0,1	0,03	0,01
6	191,1	143,0	37,0	0,1	0,01	0,01
7	85,4	60,0	38,7	0,1	0,01	0,01
8	109,0	103,0	49,0	0,1	0,01	0,01
9	133,0	62,6	40,0	0,1	0,1	0,01
10	130,0	117,0	70,0	0,1	0,01	0,01

Apêndice 61. Níveis de ácido lipoteicóico detectados nas bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com lesão periodontal primária e envolvimento endodôntico secundário por meio de ensaio de imunoabsorção enzimática – ELISA.

Caso	CP1	CP2	CP3	CE1	CE2	CE3
1	598,0	594,0	584,0	588,0	388,0	204,0
2	631,0	678,0	497,0	381,0	395,0	245,0
3	729,0	431,0	628,0	430,0	156,0	368,0
4	766,0	715,0	604,0	300,0	339,0	161,0
5	884,0	374,0	368,0	518,0	388,0	252,0
6	551,0	358,0	531,0	300,0	281,0	518,0
7	611,0	198,0	160,0	274,0	127,0	96,0
8	312,0	278,0	58,0	320,0	108,0	82,0
9	557,0	418,0	186,0	476,0	464,0	65,0
10	551,0	127,0	22,0	252,0	173,0	122,0

ANEXOS

Anexo 1. Certificado de aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP.

	<p>COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS</p>	
<h3>CERTIFICADO</h3>		
<p>O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa "Monitoramento clínico, microbiológico, imunológico e biomolecular das diferentes condições pulpares e perirradiculares", CAAE 86140218.0.0000.5418-Versão: 4, dos pesquisadores Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes, Emely de Aveiro, Juliana Delatorre Bronzato, Ezequiel Gabrielli, Lidiane Mendes Louzada, Maria Eunice da Silva Davidian, Vito Madio Chiarelli Neto e Rodrigo Arruda Vasconcelos satisfaz as exigências das resoluções específicas sobre ética em pesquisa com seres humanos do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde e foi aprovado por este comitê em 10/08/2018.</p>		
<p>The Research Ethics Committee of the Piracicaba Dental School of the University of Campinas (FOP-UNICAMP) certifies that research project "Clinical, microbiological, immunological and biomolecular monitoring of different pulp and periradicular conditions", CAAE 86140218.0.0000.5418-Version: 4, of the researcher's Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes, Emely de Aveiro, Juliana Delatorre Bronzato, Ezequiel Gabrielli, Lidiane Mendes Louzada, Maria Eunice da Silva Davidian, Vito Madio Chiarelli Neto and Rodrigo Arruda Vasconcelos, meets the requirements of the specific resolutions on ethics in research with human beings of the National Health Council - Ministry of Health, and was approved by this committee on August, 10 2018.</p>		
 Profa. Fernanda Miori Pascon Vice Coordenador CEP/FOP/UNICAMP	 Prof. Jacks Jorge Junior Coordenador CEP/FOP/UNICAMP	
<p><small>Nota: O título do protocolo e a lista de autores aparecem como fornecidos pelos pesquisadores, sem qualquer edição. Notice: The title and the list of researchers of the project appears as provided by the authors, without editing.</small></p>		

Anexo 2. Termo de consentimento livre e esclarecido específico para a pesquisa.



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

Gostaríamos de convidá-lo a participar da pesquisa intitulada:

“Monitoramento clínico, microbiológico, imunológico e biomolecular das diferentes condições pulpares e perirradiculares”

1 – Apresentação da pesquisa:

1.1 Identificação da instituição

Faculdade de Odontologia de Piracicaba – Universidade Estadual de Campinas
Endereço: Avenida Limeira, 901, Bairro Areião, CEP: 13414-903 – Piracicaba – SP.
Telefone: (19) 2106-5215 (Endodontia)

1.2 Responsável pela pesquisa

As informações contidas neste documento foram fornecidas pela orientadora Prof. Dr^a. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes e/ou pelos pesquisadores Emelly de Aveiro, Ezequiel Gabrielli, Juliana Delatorre Bronzato, Lidiane Mendes Louzada, Maria Eunice da Silva Davidian, Rodrigo Arruda Vasconcelos e Víto Madio Chiarelli Neto, responsáveis também pela apresentação e obtenção do consentimento.

1.3 Justificativa

- a. Este trabalho visa investigar a presença bacteriana em casos de dentes com polpa vital e indicação protética (que servirá como controle), pulpíte irreversível, abscesso periapical (agudo e crônico), dentes com envolvimento periodontal crônico e com lesão endo-periodontal combinada, dentes com insucesso do tratamento endodôntico com necessidade de retratamento ou de cirurgia pararendôntica. A realização desta pesquisa servirá para avaliar o efeito do tratamento na redução destas bactérias.
- b. Investigar o conteúdo tóxico de bactérias, avaliando a contribuição destas moléculas no desenvolvimento de dor e presença de lesões no ápice do dente.
- c. Pesquisas realizadas em nosso laboratório alertaram sobre o aumento da resistência à antibióticos de determinadas bactérias encontradas em canais radiculares de dentes com insucesso do tratamento endodôntico. Desta forma, é necessário um acompanhamento da resistência aos antibióticos destas bactérias.

2 – Informações sobre a pesquisa:

2.1 Objetivo geral

Avaliar a influência das bactérias e seus produtos tóxicos na indução de inflamação/infecção em dentes. E também avaliar o efeito do tratamento de canal na redução e/ou eliminação desse conteúdo em canais radiculares, objetivando analisar o efeito das diferentes formas de tratamento utilizadas.

Visa também investigar se há resistência ou não das bactérias aos antibióticos usados rotineiramente em endodontia

2.2 Procedimentos e metodologias

Seleção dos pacientes

Inicialmente serão analisadas as fichas dos pacientes cadastrados na Área de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP/UNICAMP) encaminhados aos Cursos de Atualização e Especialização. Ao final, serão selecionados 440 voluntários com idade entre 18 e 60 anos, de ambos os sexos e independente de raça. Os pacientes serão divididos em grupos de acordo com a condição do dente. Serão excluídos voluntários que trataram o dente a menos de 2 anos; que tenham usado antifúngicos e antibióticos em menos de 3 meses; dentes com fratura na raiz; dentes com extensa destruição; dificuldade de acesso ao canal radicular; e dentes sem restauração, seja temporária ou definitiva.

Anexo 2. Termo de consentimento livre e esclarecido específico para a pesquisa (continuação).



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



Exame clínico (anamnese e exame físico)

Serão anotados dados pessoais dos pacientes tais como idade e gênero, história médica e dentária.

Exame clínico e radiográfico

Antes de iniciar o tratamento, durante o exame clínico inicial serão registradas informações sobre o dente, onde será verificada a presença/ausência de dor, natureza da dor, dor à percussão (horizontal e vertical) e à palpação. Também serão anotados dados tais como: presença/ausência de edema (inchaço), flutuação, mobilidade dental e bolsa periodontal. Todas essas características clínicas serão anotadas na ficha clínica de cada paciente.

Coleta de amostras

As coletas clínicas do canal radicular, bolsas periodontais e lesões periapicais serão realizadas na Clínica de Especialização da FOP/UNICAMP, e as amostras processadas no Laboratório de Microbiologia Endodôntica.

Serão utilizadas técnicas assépticas e instrumentos esterilizados. Haverá a extração de ceras e restaurações definitivas, assim como a realização do isolamento absoluto para não haver infiltração de saliva durante o procedimento.

Antes do atendimento, será realizada a descontaminação do rosto do paciente com cloroxina gel 2% e anestesia local no região do dente envolvido. Após a abertura do dente, será utilizado o localizador apical (Nivopex, Foram Technologies, Elshon lo-ciss, Israel) para confirmar se o canal está totalmente acessível para o tratamento e obter o comprimento da raiz.

Para as coletas das amostras, cones de papel absorventes estéreis e apicógraficos serão introduzidos no dente, permanecendo nesta posição por 60 segundos.

A instrumentação do dente será realizada por írris acionadas a motor e manuais, possibilitando posterior obstrução do canal radicular. Serão utilizadas substâncias químicas rotineiramente utilizadas no tratamento de canal para instrumentação dos dentes. Em alguns grupos serão colocados medicação intracanal durante 30 dias. Posteriormente, o dente será obturado e selado com restauração definitiva.

Para a coleta periodontal um cone será introduzido até o fundo da bolsa periodontal permanecendo por 1 minuto. Em seguida, esse cone será transferido para frascos de vidro apicógraficos e armazenados em freezer -20 °C.

Para coleta de lesões periapicais, as amostras serão coletadas após acesso cirúrgico durante cirurgia apical, com o uso de microscópio operatório DFVascocentrus, (DFV, São Paulo). Após assépsia do campo operatório com solução de iodopovidine a 7,5% e aplicação de anestesia local, será feita incisão, levantamento de retalho e acesso ao ápice radicular com baixa rotação equipada com broca cilíndrica carbido-tungstênio sob aplicação de solução salina fosfatada tamponada, estéril (PBS com pH de 7,4) para irrigação. Então a lesão periapical será curada.

2.3 Possibilidades de inclusão em grupo controle ou placebo

Alguns participantes poderão ser incluídos no grupo controle, pois também será realizado o tratamento de pacientes que apresentam indicação protética em dentes vivos (com o objetivo de instalar pilas na raiz do dente), para verificar-se as condições biológicas do dente sadio. Nesta situação a indicação estará bem adaptada, não havendo recrutamento extra de voluntários, pois os pacientes já estarão encaminhados para a realização do tratamento endodôntico.

2.4 Métodos alternativos para obtenção da informação ou tratamento da condição

Não há formas alternativas de obtenção da informação desejada ou tratamento da condição.

2.5 Desconforto ou riscos esperados

A pesquisa tentará minimizar ao máximo possíveis desconfortos, principalmente aqueles relacionados à dor pós-operatória, através de um monitoramento contínuo dos pacientes e a utilização de materiais e técnicas adequadas e seguras. Independentemente do grupo, todos os pacientes receberão um tratamento seguro e eficaz, para evitar dor e desconforto durante e após o procedimento clínico.

O tratamento será convencional, com a aplicação de anestesia local, isolamento absoluto, utilização de instrumentos estéreis e a utilização de equipamentos de proteção individual (óculos de proteção, máscara, luvas, etc), tanto para o paciente quanto para o pesquisador.

Os instrumentos e substâncias químicas utilizadas são constantemente testados e aprovados em pesquisas científicas publicadas na área. Serão adotadas ainda, algumas combinações de medicação intracanal, principalmente nos casos onde se espera maior resistência bacteriana, a fim de combater a infecção dos canais radiculares.

Os procedimentos não acarretam risco de morte para os pacientes, assim como também não exige cuidados extras, já que se trata de atendimento convencional realizado diariamente nesta Faculdade.

Qualquer desconforto ou risco são de natureza própria do tratamento endodôntico convencional, não havendo

Anexo 2. Termo de consentimento livre e esclarecido específico para a pesquisa (continuação).



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



desconforto ou riscos relacionados as coletas da pesquisa. O processo é inicialmente sem dor e, caso haja dor, esta não será devido à coleta de amostra e sim referente à inflamação/infeção nos canais radiculares e/ou tecidos periradiculares. Os procedimentos descritos nesses trabalhos estão em acordo com os tratamentos indicados e realizados atualmente na área de Endodontia da FOP/UNICAMP.

2.6 Benefícios do experimento

Não há benefício direto e específico pela participação na pesquisa.

2.7 Forma de acompanhamento e assistência ao participante:

Se houver dor fora dos dias marcados para o tratamento, o paciente receberá uma assistência imediata dos responsáveis pela pesquisa, assim o mesmo deverá entrar em contato através dos telefones locais descritas a seguir:

(0xx19) 2106-5215 (laboratório de Endodontia)
 (0xx19) 98154-2449 (celular da pesquisadora Emilly de Azeite)
 (0xx54) 99929-8229 (celular do pesquisador Enzoel Gabrielli)
 (0xx19) 99699-4290 (celular da pesquisadora Juliana Delatorre Brzezinski)
 (0xx16) 99703-2333 (celular da pesquisadora Lidiara Mendes Louzada)
 (0xx11) 98279-3158/2648-2752 (celular da pesquisadora Maria Ênica da Silva Davidián)
 (0xx19) 98244-7581 (celular do pesquisador Rodrigo Arrada Vasconcelos)
 (0xx19) 99747-3877 (celular do pesquisador Vito Mauro Chiarelli Neto)

O paciente também poderá ser atendido no Plantão de Emergência da FOP-UNICAMP conforme a disponibilidade deste serviço, que funciona normalmente de segunda à sexta-feira, de 8:00 às 12:00 h e de 13:30 às 17:30 h.

Para qualquer informação ou esclarecimento sobre o tratamento, o paciente poderá entrar em contato com os pesquisadores através dos telefones citados acima, e-mail: emilly.azeite@unicamp.br, gabriellifoschini@gmail.com, marcelavilani@gmail.com, lidiara.mendes77@vulvox.com, julianadelatorre.br@hotmail.com, vasconcelosrodrigo@vulvox.com, vitchiarelli@gmail.com, e bragamin@fop.unicamp.br, assim como no endereço Rua: Regerne Feijó, nº 639, centro.

O paciente tem toda a liberdade de pedir esclarecimentos sobre como serão feitos o tratamento e as coletas, antes e durante a pesquisa, podendo ou não concordar em participar da mesma. Caso recuse, seu tratamento será prosseguido normalmente, se o mesmo demonstrar interesse. Uma via assinada/rubricada deste termo (TCLE) será entregue ao voluntário, portanto o mesmo terá em mãos telefones e endereços para contato.

Apesar dos resultados serem divulgados publicamente para fins acadêmicos e científicos, será preservada a privacidade do indivíduo quanto aos dados confidenciais que possam a ser envolvidos na pesquisa.

ATENÇÃO: A sua participação em qualquer tipo de pesquisa é voluntária. Em caso de dúvida quanto aos seus direitos como voluntário da pesquisa, escreva para o Comitê de Ética em Pesquisa da FOP – UNICAMP, endereço a Av. Limeira, 901 – Caixa Postal 52, CEP 13414-903, fone (19) 2106-5340, e-mail cepf@fop.unicamp.br, no cidade de Piracicaba SP.

3 – Garantias:

- a- O voluntário tem a garantia de que receberá respostas a qualquer pergunta ou esclarecimento a respeito dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados à pesquisa.
- b- Não haverá necessidade de deslocamentos ou procedimentos adicionais para coleta de amostra, além das necessárias para o tratamento endodôntico convencional (04 sessões) ou cirurgia periradicular. Não há previsão de ressarcimento, pois não há risco previsível pela participação na pesquisa.
- c- O voluntário tem a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo e assim do grupo de amostra, este não será penalizado e não haverá prejuízo ao seu tratamento, o qual será prosseguido normalmente.
- d- Todos os dados coletados e qualquer informação referente a este estudo permanecerá confidencial, assegurando proteção à imagem, sigilo e respeitando valores sociais, culturais, morais, éticos e religiosos. Os resultados desta pesquisa serão divulgados apenas para fins científicos, porém a identidade dos voluntários não será divulgada.
- e- Este termo de consentimento livre e esclarecido foi gerado em duas vias, sendo uma direcionada ao voluntário e outra ao pesquisador. Todas as páginas serão rubricadas pelos sujeitos da pesquisa e responsável.

Anexo 2. Termo de consentimento livre e esclarecido específico para a pesquisa (continuação).



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



4 – Consentimento informado

Eu, _____, RG _____, certifico que tendo lido as informações acima e suficientemente esclarecido (a) de todos os itens pela Prof. Dr^a. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes, Emilly de Aveiro, Enaquiel Gabrielli, Juliana Delatorre Bronzato, Lidiane Mendes Louzada, Maria Eunice da Silva Davidian, Rodrigo Arnado Vasconcelos e Vito Medeo Chiarelli Neto, estou plenamente de acordo com a realização do experimento. Assim, eu autorizo a execução da pesquisa, exposta acima, em mim.

Piracicaba, ____ / ____ / ____.

Assinatura do Paciente

Nome: _____

RG: _____

Assinatura do Pesquisador

*Todas as páginas deverão ser rubricadas pelos sujeitos da pesquisa e responsável.

Anexo 3. Relatório de verificação de originalidade e prevenção de plágio.

LIDIANE FINAL

RELATÓRIO DE ORIGINALIDADE



FONTES PRIMÁRIAS

1	repositorio.unesp.br Fonte da Internet	2%
2	bdtd.ibict.br Fonte da Internet	2%

Excluir citações

Desligado

Excluir correspondências

< 1%

Excluir bibliografia

Em