

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

HELOISA CARDOSO MARTINS

O PAPEL DO LPS NO DESENVOLVIMENTO E MANUTENÇÃO DAS LESÕES
PERIAPICAIS

CURITIBA
2013

HELOISA CARDOSO MARTINS

O PAPEL DO LPS NO DESENVOLVIMENTO E MANUTENÇÃO DAS LESÕES
PERIAPICAIS

Monografia apresentada ao Curso de Especialização em Endodontia, Curso de Odontologia, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Especialista em Endodontia.

Orientador: Prof. Dr. Gilson Blitzkow Sydney.

CURITIBA
2013

TERMO DE APROVAÇÃO

HELOISA CARDOSO MARTINS

O PAPEL DO LPS NO DESENVOLVIMENTO E MANUTENÇÃO DAS LESÕES PERIAPICAIS

Monografia aprovada como requisito parcial para obtenção do título de Especialista em Endodontia no Curso de Especialização em Endodontia, Curso de Odontologia, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:

Prof. Dr. Gilson Blitzkow Sydney
Orientador – Titular de Endodontia UFPR

Prof. Dr. Antonio Batista
Departamento de Odontologia Restauradora UFPR

Profa. Dra. Marili Doro Andrade Deonizio
Departamento de Odontologia Restauradora UFPR

Prof. M.Sc. Alexandre Kovalczuck
Departamento de Odontologia Restauradora UFPR

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus.

Agradeço ao meu noivo Manoel Borges por estar sempre presente em todos os momentos da minha vida, pelo apoio precioso e por ser uma pessoa em que tenho eterna confiança.

Agradeço a minha mãe, Leide Cardoso Martins, por ser a base da minha caminhada e por sempre me incentivar à aquilo que é digno de se ter na vida.

As minhas amigas Vanessa Sanglard, Thayana Souza e Karin Noga. Que ainda possamos mostrar que o tempo e a distancia não são capazes de desfazer grandes amizades! Obrigada por tudo!

Agradeço aos meus Professores Antonio Batista, Marili Doro e Alexandre Kowalczuck por me ajudarem imensamente nesta caminhada profissional.

Em especial, ao Professor Gilson Blitzkow Sydney, meu orientador, por ser o espelho em quem me inspiro para esta profissão, pelo apoio e auxílio na arte endodôntica antes mesmo de eu fazer parte deste seleto grupo de Especialização em que tanto almejei participar.

“...que não nos falte a coragem, a fé e a lembrança da presença de Deus em nossas vidas.” - Francisco Cândido Xavier.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISTA DE LITERATURA	02
3. DISCUSSÃO	
3.1 QUANTO À FLORA MICROBIANA	53
3.2 A INTERAÇÃO MICROBIANA	54
3.3 A FORMAÇÃO DA LESÃO	58
3.4 O PAPEL DO PREPARO DO CANAL	65
3.5 O PAPEL DA MIC	69
3.6 A AÇÃO DO Ca(OH)₂ SOBRE O LPS	70
4. CONCLUSÕES	74
5. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA	76

RESUMO

Bactérias Gram negativas exercem um papel fundamental nas infecções endodônticas primárias. Elas apresentam diversos fatores de virulência, tais como a endotoxina, uma molécula responsável pela iniciação e perpetuação da periodontite apical. A proposta deste trabalho é revisar o papel das bactérias Gram-negativas nas infecções endodônticas, conceituar estrutura e mecanismo de ação da endotoxina/LPS na iniciação do processo de reabsorção óssea inflamatória em canais radiculares infectados e efeitos do hidróxido de cálcio, visto como única forma de medicação intracanal efetiva para inativação do lipopolissacarídeo bacteriano.

Palavras-Chave: endotoxina; LPS bacteriano; lipopolissacarídeo bacteriano; periodontite apical.

ABSTRACT.

Gram-negative bacteria play an essential role in primary endodontic infections. They have several virulence factors such as endotoxin, a large molecule that plays a role in the initiation and perpetuation of apical periodontitis. This paper reviews the role of gram-negative bacteria in endodontic infections, structure and action of endotoxin in the initiation of inflammatory bone resorption in infected root canals, effects of calcium hydroxide, seen as the only intracanal medicament which is capable to inactivate bacterial endotoxin.

Key-Words: endotoxin; bacterial LPS; bacterial lipopolysaccharide; apical periodontites.

1. INTRODUÇÃO.

Durante o processo infeccioso, componentes microbianos ou subprodutos bacterianos aderem aos tecidos do hospedeiro e resistem aos seus mecanismos de defesa. Além disso, os subprodutos bacterianos podem danificar diretamente o tecido do hospedeiro através da liberação de seu potencial tóxico ou indiretamente, pela indução de uma resposta imunopatológica do hospedeiro através de receptores celulares específicos presentes na superfície de macrófagos quando estes estiverem em contato com o LPS.

Assim, bactérias gram – desempenham um papel essencial nas infecções endodônticas primárias. O Lipopolissacarídeo, componente presente na parede celular dessas bactérias, é um dos mais importantes fatores de virulência bacterianos, desempenhando um papel fundamental na iniciação, desenvolvimento e manutenção da inflamação periapical.

O LPS ou Endotoxina é liberado pelas bactérias gram – durante crescimento e morte celular, e tem sido detectado em casos de infecção primária de canais radiculares. Grande quantidade de endotoxina foi relacionada como sendo responsável pela dor espontânea, sensibilidade à palpação e à percussão, inflamação periapical, reabsorção de osso alveolar e estimulação de citocinas (mediadores inflamatórios que encabeçam destruição tecidual).

O LPS protege a célula bacteriana da ação de anticorpos e do sistema complemento do hospedeiro; é um receptor bacteriofágico e é uma das maiores moléculas endotóxicas das bactérias gram – sendo portanto considerada o mais importante fator de virulência dessas bactérias.

A proposta desta revista de literatura é conceituar o lipopolissacarídeo bacteriano e desvendar a razão pela qual em certos casos após o preparo químico-mecânico e sanificação do canal radicular ocorrem agudizações e a não cura de lesões periapicais. Para se alcançar o máximo de desinfecção do sistema de canais radiculares, o tratamento endodôntico não deve somente eliminar bactérias e substratos, mas deve também inativar o LPS. Devido à alta toxicidade da endotoxina, uma atenção especial tem sido dada a fim de se obter uma substância que a inative, eliminando assim seu potencial biologicamente tóxico. O Hidróxido de Cálcio utilizado como medicação intracanal parece suprimir diretamente os efeitos biológicos do LPS.

2. REVISTA DA LITERATURA

Hausmann *et al* (1972) estudaram os efeitos do lipopolissacarideo sobre reabsorção óssea em cultura tecidual. O estudo teve interesse em determinar a) o efeito do método e do grau de purificação da atividade reabsortiva ossea, b) a relação entre osso e atividade biológica do lipopolissacarideo na atividade reabsortiva. Constatou-se que o lipopolissacarideo estimula a reabsorção de osso em cultura tecidual como analisado morfológicamente e através da liberação de ions cálcio dos ossos. Associado a este efeito observou-se também: a) liberação de acido lático, b) aumento do número total de células em osso, c) presença de osteoclastos, d) diminuição da quantidade de matriz óssea. Lipopolissacarideo com a porção lipídica removida perde a capacidade de estimulação de reabsorção óssea. Não há relação entre a habilidade do lipopolissacarideo em estimular a reabsorção óssea e pirogenicidade ou sua capacidade de neutralizar anticorpos. O mecanismo de liberação de ions calcio dos ossos em culturas teciduais são primariamente metabolicos e de troca. A magnitude de troca do componente pode ser estimada a partir da quantidade de ions calcio liberados dos ossos. Existe uma similaridade muito grande entre a ação do LPS e atividade do hormonio paratireoidiano. Tem sido sugerido que a concentração de calcio dentro do tecido é responsavel para o efeito do hormonio PTH e a mesma explicação pode ser utilizada para o mecanismo pelo qual o lipopolissacarideo aumenta celularidade. O lipopolissacarideo não estimula a reabsorção acima do que o paratormonio induz. Isso sugere que o caminho final para o inicio da reabsorção ossea é o mesmo para estes dois agentes. O lipopolissacarideo parece aumentar a atividade adenilcilase e conseqüentemente, o ciclo intracelular de AMP. O lipopolissacarideo é um ativador eficiente do sistema complemento. Existe uma interação entre lipopolissacarideo e sistema complemento que é muito importante, in vivo, para mediar certas reações do hospedeiro frente ao LPS. O potencial em reabsorver osso do lipopolissacarideo deve residir na porção lipidica da molecula já que nenhuma atividade de reabsorção ossea pode ser observada nos preparos de LPS livres em mais de 80% da porção lipidica convencional.

Dwyer *et al* (1981) avaliaram radiograficamente e histologicamente o efeito da endotoxina em tecido periapical de gatos. A endotoxina da bacteria *E coli* foi utilizada para este estudo. Cada gato foi anestesiado e radiografias iniciais foram tiradas de caninos

superiores e inferiores. Os dentes foram isolados, previamente desinfetados e a polpa foi exposta e extirpada. Os canais foram irrigados com solução salina e secados com pontas de papel absorvente esteril. 0,1 ml de endotoxina em diferentes concentrações foi inoculado em um grupo de dentes e 0,1 ml de solução salina em outro grupo. Os dentes foram selados com IRM. Para se investigar o mecanismo envolvido na patogenese da doença periapical, 3 gatos tiveram inoculação de solução de LPS inativada em diferentes concentrações. Após 2,4 e 6 semanas, os gatos foram radiografados novamente e sacrificados. Nos gatos que tiveram endotoxina inoculada, uma amostra sanguínea da veia jugular foi coletada. O exame de imunodifusão é usado para se determinar a presença de anticorpos contra a endotoxina na circulação dos gatos. Os caninos foram removidos juntamente com o tecido periapical presente ao redor das raízes. As amostras foram fixadas em formalina e decalcificadas com ácido fórmico, desidratadas e embebidas em parafina. Secções de 6µm foram preparadas e coradas com hematoxilina e eosina para exame histopatológico. Como resultado radiográfico, radiolucidez apical foi visível em dentes com endotoxina após 2 semanas e essas mudanças se firmaram após 4 e 6 semanas. Os dentes inoculados com solução de endotoxina concentrada apresentaram radiolucidez importante. Os dentes inoculados com solução salina não apresentaram alteração periapical. Os dentes inoculados com LPS inativado foram excluídos dos resultados estatísticos. Teste de Friedman foi utilizado para se determinar as diferentes reações ao tratamento e o teste de Wilcoxon foi utilizado para determinar as diferenças entre os tipos de tratamento de acordo com os diferentes tamanhos de lesão. Os resultados destes 2 testes apontaram diferenças significativas entre os dentes tratados com endotoxina e os tratados com solução salina, porém não apontaram diferenças entre as diferentes concentrações de endotoxina inoculadas. Como resultado histológico, a inflamação foi mais intensa em dentes tratados com LPS quando comparados aos que foram tratados com solução salina ou LPS inativado. Como resultado do teste de imunodifusão, não houve formação de anticorpos em nenhum caso. Conclui-se que a endotoxina tem a sua participação na iniciação e perpetuação de lesão inflamatória em humanos.

Shoenfeld *et al* (1982) avaliaram a atividade da endotoxina em lesões periapicais. Amostras teciduais de lesões apicais foram obtidas de dentes sem envolvimento periodontal. Os tecidos foram coletados durante a apicectomia, fixados em formalina e

enviados para o patologista para avaliação histológica. Os tecidos foram analisados microscopicamente após coloração hematoxilina e eosina e classificados em granuloma, cicatriz apical ou cisto. Foi usada a análise Limulus Amebocyte Lysate para se detectar a presença de endotoxina. O princípio desta análise é que o preparado de lisato dos amebócitos circulantes do carangueijo rei ou carangueijo pata de cavalo é incubado com o material a ser testado. A presença de endotoxina causa a lise dos amebócitos em um coágulo que resulta numa massa aderente e turva no fundo do tubo de ensaio. Como resultados do grupo dos granulomas 71% apresentaram reação positiva, enquanto que para o grupo das cicatrizes apicais, 33% foi positivo para endotoxina. A presença da endotoxina é portanto fortemente relacionada a presença de inflamação. Os resultados mostram que o produto bacteriano(endotoxina) presente de fato em canais radiculares de dentes com polpa necrosada é também presente em área periapical com dentes com granulomas. A presença de endotoxina nas lesões está fortemente correlacionada com a inflamação. Os produtos bacterianos invadem tecido apical de canais radiculares contaminados. Esses produtos tem efeitos deletérios nas células e tecidos conectivos ao redor do ápice do dente; eles são sem dúvida antígenicos e podem desencadear resposta imunológica do hospedeiro, que por sua vez media a inflamação e destruição tecidual. A endotoxina bacteriana é uma substância potencialmente tóxica para uma variedade de células incluindo os fibroblastos, e podem ativar o sistema complemento. A ativação do sistema complemento induz a liberação de peptídeos e anafilatoxinas que são potentes mediadores da inflamação. Assim, a presença do lipopolissacarídeo em tecidos periapicais pode contribuir para a ocorrência de doença apical, mesmo sem nenhuma bactéria viável presente.

Yamasaki *et al* (1992) mediram a quantidade de endotoxina e identificaram as espécies gram – responsáveis pelo aparecimento de lesões periapicais induzidas em ratos Wistar. Noventa ratos foram selecionados, para grupo controle e grupo experimental. Os animais do grupo controle não receberam nenhum tratamento. Os animais do grupo experimental foram anestesiados e tiveram a polpa exposta ao ambiente oral em um período que variava de 1 a 70 dias para cada subgrupo. Os animais foram sacrificados e uma seção do terço apical da raiz mesial junto com tecido periapical de molares inferiores do lado direito foram removidos. Essa seção é triturada em pó. Água destilada esterilizada livre de endotoxina é misturada a esse pó e depois a mistura é liofilizada. O kit

Endospey de colorimetria é utilizado para se medir a quantidade de endotoxina da mistura e finalmente um espectrofotometro mede a absorbancia. O tecido periapical de molares inferiores do lado esquerdo foi removido. A secção foi desinfectada com um cotonete contendo tintura de iodo para depois diluida, agitada e introduzida em cultura para anaerobios, mantendo-se em incubação por 7 dias a 37°C. No grupo controle, a quantidade de endotoxina em tecido periapical não se alterou durante todo o tempo de experimento e nenhuma bacteria gram – foi isolada. No grupo experimental, a quantidade de endotoxina em tecido periapical aumentou gradativamente no periodo de 1 a 70 dias, alcançando o maior nivel após o 7º dia. Bacterias gram – foram isoladas do tecido periapical e sua quantidade aumentou gradativamente até o 14º dia, mas diminuiu a partir do 21º dia. Desses resultados pode-se concluir que a quantidade de endotoxina em tecido periapical aumenta gradualmente com o tempo e que bacterias gram – foram isoladas da mesma região, porem, não aumentaram em numero. Esses resultados mostram claramente que a endotoxina é envolvida durante formação da lesao periapical. A quantidade de bacterias provavelmente também aumentou durante o periodo de 21-70 dias, porem, devido ao acumulo de endotoxina, isso não pode ser confirmado com certeza. O numero de bacterias anaerobias restritas não aumentou com o tempo.

Safavi *et al* (1993) avaliaram os efeitos do hidroxido de calcio sobre o LPS bacteriano. Tubos de vidro contendo suspensão aquosa de LPS da Bacteria *Salmonella typhimurium* com hidroxido de calcio em pó ou agua esterilizada foram agitados por 20 segundos e incubados a 37º C por 7 dias. As amostras foram preparadas e analisadas para se estudar os niveis de acidos graxos livres atraves de um cromatógrafo a gás equipado com espectometro de massa. Como resultado, o LPS tratado com hidroxido de calcio mostrou elevadas quantidades de acidos graxos hidrolisados, concluindo-se que o hidroxido de calcio é capaz de hidrolisar a cadeia lipidica do lipopolissacarideo bacteriano. A alta efetividade do hidroxido de calcio como medicação intracanal é atribuida ao grupo hidroxila, que promove um ambiente alcalino. Alem da baixa solubilidade, a dissociação do ion hidroxila aumenta o PH do meio, o suficiente para matar as bacterias. Devido sua baixa solubilidade, uma grande quantidade de hidroxido de calcio pode ser acomodada no interior do canal radicular sem riscos de irritação periapical. A inativação do LPS pela degradação do lipideo A tem sido demonstrada usando uma variedade de métodos incluindo desacilação com enzimas e hidrolise de acidos, alem de tratamento alcalino. O

tratamento alcalino inativa o LPS removendo ácidos graxos esterificados e modificando sua conformação química. (NIWA *et al.*, 1969). A hidrólise do LPS é alcançada com hidróxido de sódio diluído e é facilitada com álcool etílico ou dimetilsulfóxido (NIWA *et al.*, 1969). Essas afirmações suportam os resultados que demonstraram que a diluição alcalina do LPS libera ácidos graxos das ligações ésteres. Esses resultados sugerem que a degradação da molécula de LPS mediada pelo hidróxido de cálcio pode ser uma importante razão para se justificar os efeitos benéficos obtidos através de sua utilização clínica.

Nakane *et al* (1995) avaliaram os efeitos do lipopolissacarídeo da *Porphyromonas gingivalis* sobre as células da polpa dental humana. As células da polpa dental humana, de dentes extraídos foram tratadas com LPS. Os efeitos do tratamento foram examinados através da medida de conteúdo de DNA pela análise de Hinegardner, conteúdo de proteína pela análise Bio Rad e atividade da fosfatase alcalina nas células. As amostras de LPS purificadas eram dos patógenos conhecidos como *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Fusobacterium nucleatum* e *Escherichia coli*, sendo este último usado somente no grupo controle. Como resultados, a produção de DNA pelas células da polpa estava aumentada significativamente quando do uso de LPS da *E coli* a concentração de 10ug/ml por 10 e 14 dias e inibida a concentração de 100ug/ml para todos os períodos. A produção de DNA pelas células da polpa estava aumentada quando do uso de LPS da *P gingivalis* a 10ug/ml por 3,7 e 10 dias e inibida a concentração de 100ug/ml por 3 e 7 dias. A produção de DNA pelas células da polpa estava reduzida quando usou-se LPS da *P endodontalis* a 100ug/ml por 3 e 7 dias e aumentada para o LPS da *F nucleatum* a 10ug/ml por 3 e 7 dias e diminuída se a concentração de LPS da *F nucleatum* era de 100ug/ml por 3, 7 e 10 dias. O LPS da *E coli* a 10ug/ml inibiu a produção de proteínas pelas células da polpa em 3 e 7 dias e a 100ug/ml, inibiu a produção de proteínas em todos os períodos do experimento. O LPS da *P gingivalis*, *P endodontalis* e *F nucleatum* a 100ug/ml bloqueou síntese proteica nos períodos de 3, 7 e 10 dias. A atividade da fosfatase alcalina se manteve inalterada por qualquer qualidade de LPS ou qualquer concentração dele, em todos os períodos. Assim, o LPS tem efeitos citotóxicos em várias células, tais como linfócitos e fibroblastos do ligamento periodontal, estimulando-os a produzir citocinas tais como fator de necrose tumoral A, interleucina 1 e 6. Essas citocinas são mediadores de inflamação. É preciso investigar de forma mais apurada a relação entre LPS e a liberação de citocinas pelas células da polpa dental

humana.

Hosoya *et al* (1997) examinaram a produção de interleucina 1B na polpa dental humana tratada com lipopolissacarídeos da bactéria *Porphyromonas endodontalis*. Interleucina 1B é sintetizada como um precursor inativo que posteriormente é processada por uma enzima. É encontrada extracelularmente como um polipeptídeo biologicamente maduro e ativo. A interleucina 1B tem sido detectada em polpa dental necrosada e inflamada. Nas doenças infecciosas a invasão do hospedeiro pelos microrganismos frequentemente induz a uma ampla variedade de reações inflamatórias e imunopatológicas. A identificação de várias citocinas como agentes de ampla atividade biológica ganhou atenção no que se refere a doenças crônicas e agudas e a interleucina 1B é uma citocina pró-inflamatória produzida por uma variedade de células tais como fagócitos mononucleares, leucócitos polimorfonucleares queratinócitos e células endoteliais. Na doença pulpar o aumento do nível de interleucina 1B na pulpite pode estimular a inflamação. Bactérias gram negativas que são frequentemente detectadas em canais radiculares infectados e polpa necrótica, são suspeitas de induzir a inflamação. Os componentes celulares tem função como fator de virulência e nas bactérias gram negativas esses componentes estão em sua superfície. O LPS tem sido caracterizado como uma molécula que media um grande número de atividades biológicas que levam a destruição do tecido do hospedeiro melhorando a reação inflamatória e reabsorção óssea através dos fatores prostaglandina E2, colagenase, interleucina 6 e fator de necrose tumoral. O LPS também estimula a produção de interleucina 1B pelas células progenitoras de osteoblastos e fibroblastos gengivais. Demonstrou-se que tanto a bactéria quanto o LPS estimularam a liberação de interleucina 1B das células da polpa dental. Entretanto, a atividade da enzima que matura a interleucina 1B não foi aumentada pela bactéria ou pelo LPS. Estes resultados sugerem que a estimulação para a liberação de interleucina 1B pelas células da polpa dental humana através da bactéria ou do LPS podem ter um importante papel na progressão da inflamação da doença pulpar e periapical.

Barthel *et al* (1997) analisaram a liberação de fator de necrose tumoral A em monócitos após exposição ao hidróxido de cálcio tratado com LPS da *E.coli*. O objetivo

desse estudo foi investigar se o potencial tóxico do LPS pode ser reduzido ou eliminado pelo hidróxido de cálcio. Preparações comerciais de LPS de *E.coli* foram obtidas como pó liofilizado. As soluções foram preparadas através da dissolução em 4 diferentes concentrações de água esterilizada. As amostras foram duplicadas. Na metade das amostras, hidróxido de cálcio foi adicionado resultando em uma solução saturada. Dois tubos livres de endotoxina, um com água e outro com hidróxido de cálcio + água serviram de controle. Todas as amostras foram agitadas por 20 segundos e incubadas a 37°C por uma semana. A cultura de monócitos foi obtida através da centrifugação do soro de sangue periférico de um doador saudável masculino. Os monócitos foram isolados. Os monócitos foram expostos a diferentes soluções de LPS. Após 4 horas os monócitos sobrenadantes foram coletados e analisados para a produção de fator de necrose tumoral usando o kit Elisa e análise estatística Anova. Os resultados indicaram que o hidróxido de cálcio é capaz de eliminar a habilidade do LPS e *E.coli* em estimular a produção de fator de necrose tumoral pelos monócitos. O presente estudo confirma a habilidade do hidróxido de cálcio em neutralizar o LPS da *E. coli* sob condições *in vitro*. Os monócitos expostos ao LPS tratado com hidróxido de cálcio por uma semana produziram níveis de fator de necrose tumoral muito abaixo quando comparados aos que foram expostos ao LPS puro. Esse resultado confirma a hipótese de que o hidróxido de cálcio inativa o LPS bacteriano.

Marton *et al* (2000) resumiram o conhecimento atual sobre os mecanismos de patogênese da periodontite apical, com foco na formação de um tecido de granulação especial que efetivamente combate a bactéria originária do canal infectado, e exercendo sua função protetora, também contribui para eventos danosos locais e distantes. Esta dinâmica de equilíbrio entre defesa e destruição promove uma base patobiológica para o melhor entendimento dos sinais clínicos e sintomas das várias formas de lesão periodontal apical, influenciando na estratégia e protocolo de tratamento.

Laghios *et al* (2000) testaram se dentes obturados permitiam a infiltração do LPS pelo patógeno *Porphyromonas gingivalis* de pacientes com periodontite refratária (*in vitro*). Habilidade em se alcançar o completo selamento apical do sistema de canais radiculares é importante para o sucesso da terapia endodôntica cirúrgica e não cirúrgica. O LPS da *Porphyromonas gingivalis* foi isolado e preparado em solução aquosa. Canais radiculares de 10 dentes humanos anteriores foram instrumentados endodônticamente.

Os últimos 3mm apicais foram ressecados e preenchidos com guta percha. Os dentes foram montados sobre um frasco de polipropileno utilizando cera pegajosa e a superfície radicular dos dentes cobertas com uma camada de verniz de unha. Os dentes foram preenchidos com o LPS. Amostras foram removidas a cada dia e enviadas para análise Slot blot para se quantificar a quantidade de LPS que vazou para o fundo do frasco. A tamanho das fendas foi analisado através de um densitometro a laser. Os dados indicaram que os dentes obturados apicalmente com guta percha apresentaram falhas, enquanto que nenhum vazamento de LPS foi detectado nos dentes cobertos completamente com verniz de unha. Conclui-se que dentes obturados no terço apical com guta percha permitiram a passagem de LPS bacteriana.

Sunde et al (2000) avaliaram se as bactérias estão presentes em lesões periapicais de dentes assintomaticos antes ou se foram transferidas após a amostragem. Trinta pacientes com tratamento endodôntico completado e lesão periapical vista na radiografia foram divididos em 2 grupos de 15 pacientes cada. No grupo 1 uma incisão marginal foi realizada para explorar a lesão periapical. No grupo 2 uma incisão submarginal foi feita. Antes da incisão, gengiva e mucosa foram lavadas com uma solução de gluconato de clorexidina 0,2 %. Amostras contendo bactérias foram coletadas da mucosa antes de se rebater retalho e também do osso alveolar e lesão periapical imediatamente após retalho. Todas as amostras foram colocadas em cultura anaeróbia. No grupo 1, 12 dos 15 pacientes apresentaram bactérias originadas das amostras da mucosa mesmo após banho de clorexidina. O crescimento bacteriano foi observado em todas as amostras coletadas do osso alveolar enquanto que nas amostras coletadas da lesão periapical observou-se crescimento bacteriano em 11 dos 15 casos. No grupo 2 o crescimento bacteriano em amostras da mucosa ocorreu em 11 dos 15 casos. 3 amostras coletadas no osso alveolar e 10 amostras coletadas da lesão periapical tiveram crescimento bacteriano positivo. A técnica utilizada para coleta de amostras impediu que bactérias da mucosa alcançassem o osso alveolar e lesão periapical. A incisão marginal permitiu que bactérias da mucosa alcançassem tecidos mais profundos. A maioria dos organismos detectados na lesão periapical eram claramente diferentes das bactérias presentes em áreas vizinhas e pareceram estar presentes antes da coleta de amostras. A contaminação da lesão periapical durante a cirurgia para retirada de amostra para análise histopatologica parece ser o obsoleto. Os dados encontrados suportam a ideia de que, em infecções de longa duração com uma microflora já estabelecida na raiz do dente, a invasão microbiana para

dentro da lesão é de fato coerente, mesmo em dentes assintomáticos.

Wang *et al* (2001) estudaram as alterações das propriedades imunológicas do LPS tratado com Hidróxido de Cálcio e estabeleceram um modelo experimental no qual células de linhagem THP1 (células derivadas de monocitos de pacientes leucêmicos) foram cultivadas *in vitro* a fim de se observar a alteração de propriedades imunológicas do LPS. Células derivadas de monocitos de pacientes leucêmicos foram utilizadas. Uma quantidade de fator de necrose tumoral A liberada por essas células estimuladas pelo LPS agiram como um índice de propriedades imunológicas de estimulação e alteração do LPS tratado com Hidróxido de Cálcio. Dentro das concentrações de solução aquosa de LPS utilizadas, as propriedades imunológicas originais do LPS diminuíram significativamente após o tratamento com Hidróxido de Cálcio por uma semana. Quando o pH do meio foi maior ou igual a 12.30, a quantidade de fator de necrose tumoral A excretado pelos monocitos não foram diferentes do grupo controle. Assim, após o tratamento com Hidróxido de Cálcio por uma semana, as propriedades imunológicas do LPS diminuíram significativamente. Alto valor de pH do meio, induzido pelo Hidróxido de Cálcio desempenhou um papel crítico durante a alteração das propriedades imunológicas do LPS.

Siqueira *et al* (2001) discutiram a etiologia do fracasso dos tratamentos endodônticos bem conduzidos e os tratamentos para as falhas. O tratamento endodôntico falha geralmente quando é conduzido de maneira inadequada. Entretanto, há alguns casos, em que mesmo seguindo-se o mais alto padrão de qualidade, o tratamento fracassa. Na maioria dos casos, a literatura sugere que o fracasso endodôntico resulta de uma infecção intraradicular persistente ou de infecções secundárias e em alguns casos, infecção extraradicular. Assim, infecção intraradicular persistente, infecção secundária e infecção extraradicular são os três principais fatores de fracasso tanto em dentes mal tratados quanto bem tratados endodônticamente.

Buck *et al* (2001) analisaram os efeitos dos irrigantes endodônticos e do hidróxido de cálcio sobre o lipopolissacarídeo bacteriano através da análise seletiva de cromatografia com monitoramento de íons. Uma solução aquosa de LPS foi misturada a uma variedade de irrigantes endodônticos por 30 minutos: Hipoclorito de sódio 2,625 %, Clorexidina 0,12%, EDTA 15%, Hidróxido de Cálcio, Etanol 95%, Hipoclorito de Sódio

2,6% + Clorexidina 0,12% e Clorexidina 0,12% + Hipoclorito de sódio 2,6% + Etanol 95%. Os tubos de testes com LPS e irrigantes foram agitados por 20 segundos e então encubados a 36°C por 30 minutos. As amostras com Hidróxido de Cálcio foram agitadas diariamente, com incubação de 24 horas, 2 dias e 5 dias. A inativação do LPS foi constatada através da mensuração da quantidade liberada de ácidos graxos livres. Os resultados obtidos mostraram que as amostras com hidróxido de cálcio encubadas por 2 e 5 dias mostraram os mais altos níveis de degradação do LPS. A mistura de clorexidina, hipoclorito de sódio e etanol também foi capaz de degradar a porção do lipídeo A. EDTA, hipoclorito de sódio, clorexidina, clorexidina+hipoclorito de sódio, etanol e o grupo controle água mostraram pequena ou nenhuma habilidade em inativar o lipídeo A da endotoxina.

Nelson-Filho *et al* (2002) avaliaram radiograficamente a região apical e periapical de dentes de cães submetidos a endotoxina bacteriana intracanal (lipopolissacarídeo ou LPS), associado ou não a medicação de Hidróxido de Cálcio. Após a remoção da polpa, 60 premolares foram divididos em quatro grupos: no grupo 1, os dentes foram preenchidos com endotoxina; no grupo 2, os dentes foram preenchidos com endotoxina e Hidróxido de Cálcio; no grupo 3, os dentes foram preenchidos com solução salina e para o grupo 4, lesões periapicais foram induzidas sem tratamento, mantendo o canal radicular exposto em meio bucal. O tempo do experimento foi de 30 dias. Lesões periapicais foram observadas nos grupos 1 e 4. A lamina dura estava intacta para os grupos 2 e 3. A endotoxina bacteriana induziu a formação de lesão periapical visível radiograficamente, porém, na presença de Hidróxido de Cálcio, a endotoxina pareceu se inativada.

Silva *et al* (2002) avaliaram histopatologicamente os efeitos do hidróxido de cálcio sobre a endotoxina bacteriana *in vivo*. Sessenta dentes de cães foram selecionados para este experimento. Vinte dentes foram separados para cada grupo 1 e 2 e 10 dentes para cada grupo controle 3 e 4. Os animais foram anestesiados, os dentes foram isolados e previamente desinfetados. Acesso coronário foi feito e o comprimento de trabalho foi determinado a 2 mm aquém do ápice radiográfico utilizando-se uma lima diâmetro 30 tipo K. A polpa foi removida e o canal radicular irrigado com solução salina, com um volume mínimo de 3,6 ml após cada troca de instrumento. O forame apical foi alargado através do uso sequencial de instrumentos tipo K de diâmetro 15 ao 30, sempre com irrigação. Após isso, a instrumentação a nível de comprimento de trabalho estabelecido anteriormente, até o instrumento 50. O instrumento 30 tipo K foi utilizado para se manter a patência dos

canais radiculares. Os canais foram irrigados, aspirados e secados com pontas de papel absorvente esterilizadas; depois preenchidos com solução de EDTA 14,3% por 3 minutos, repetindo nova irrigação e secagem. Os dentes foram então divididos em grupos:

Grupo 1 = 20 dentes receberam a inoculação de 0,1ml de solução preparada de endotoxina de E coli.

Grupo 2 = 20 dentes receberam a inoculação de 0,1 ml de solução preparada de endotoxina de E coli + pasta Calasept de hidróxido de cálcio

Grupo 3 = 10 dentes receberam solução salina.

Grupo 4 = 10 dentes ficaram expostos ao ambiente oral por 5 dias para permitir contaminação bacteriana. Após esse período, a câmara pulpar foi limpa, selada com uma bolinha de algodão + cimento óxido de zinco eugenol.

Os demais elementos, foram selados da mesma forma, aguardando um período de 30 dias. Todos os dentes foram radiografados no intervalo de 15 dias. 30 dias após o procedimento cirúrgico, os dentes foram novamente examinados radiograficamente, os animais foram mortos com sobredose anestésica e a maxila e mandíbula foram dissecadas a fim de se obter raízes individuais. As amostras foram lavadas e desmineralizadas com EDTA em microondas. As raízes foram lavadas em água corrente, desidratadas com álcool etil, fixadas em xilol e embebidas em blocos de parafina. Seções longitudinais de 6 µm foram obtidas e coradas com hematoxilina e eosina, coloração de Mallory e Brown e Breinn. Para o Grupo 1 a região apical de 19 dentes foi analisada (1 dente foi perdido) e essa apresentou uma lacuna de cimento que estava vazia ou tinha tecido conectivo desorganizado e células inflamatórias. Todas as amostras tinham área de reabsorção no cimento apical e ausência de cementoblastos na superfície radicular. O espaço do ligamento estava aumentado de forma severa em 16 raízes. Na região apical havia um denso e difuso processo inflamatório composto em sua maioria de neutrófilos. Em 18 amostras o osso alveolar tinha áreas significativas de reabsorção ativa, ausência de osteoblastos e alguns osteoclastos presentes na superfície. No Grupo 2 a região apical e periapical estava normal em 18 dos 20 casos. As ramificações do delta apical tinham tecido conectivo normal. Somente em 2 casos as ramificações estavam alargadas e vazias. O cimento apical estava regular sem áreas de reabsorção mostrando uma superfície com cementoblastos e fibras colágenas. O espaço do ligamento periodontal estava alargado somente em duas amostras. O tecido conjuntivo da região apical tinham um leve infiltrado inflamatório e intensa formação de fibras colágenas. Reabsorção óssea foi observada em 2 casos somente. No Grupo 3 todas as

amostras apresentaram as ramificações do delta apical alargadas com tecido conectivo normal em seu interior. A superfície do cimento apical estava regular onde havia somente um caso de evidência de reabsorção sem reparo. O ligamento periodontal estava levemente alargado em 6 amostras e moderado em 4. Não houve reabsorção óssea nem dentinária neste grupo. Para o Grupo 4 as lacunas de cimento estavam vazias ou contaminadas com debris necróticos e bactérias. A superfície do cimento estava irregular com áreas de reabsorção em todas as raízes. Ausência de cementoblastos na superfície. No tecido conectivo apical, áreas de necrose e inflamação. A espessura do ligamento periodontal estava significativamente aumentada em 6 amostras. O osso alveolar tinha extensivas áreas de reabsorção em todos os casos. A análise de Brown and Breinn não detectou bactérias nos grupos 1, 2 e 3 porém indicou um considerável número de microrganismos para o grupo 4. Como conclusão a endotoxina bacteriana causou lesão periapical em dentes de cães e o hidróxido de cálcio inativou o lipopolissacarídeo in vivo mesmo em altas concentrações. Isso mostra excelentes resultados do uso do hidróxido de cálcio na prática clínica como medicação intracanal antibacteriana entre sessões em dentes que apresentam polpa necrosada e reação apical visível radiograficamente. O presente estudo mostrou que depois de 30 dias, mesmo em ausência de bactérias, a endotoxina presente no canal radicular pode induzir a reações apicais visíveis radiograficamente e a um infiltrado inflamatório intenso, espessamento de ligamento periodontal, reabsorção de cimento e osso alveolar. Esses resultados se igualam aos de Dwyer e Torabinejad (1981) que mostrou que a endotoxina da E coli, quando injetada em dentes de gatos, produziu infiltrado de neutrófilos e macrófagos, além de plasmócitos, linfócitos e reabsorção óssea; e aos de Pitts *et al.* (1982), que mostrou que após 4 semanas, era possível detectar reabsorção radicular e óssea e infiltrado inflamatório. Resultados similares ao trabalho de Mattison *et al.* (1987) em dentes de cães. Nesse estudo foi mostrado que o LPS induz ao desenvolvimento de lesão periapical em dentes de cães e sugere que o Hidróxido de Cálcio o inative. Deve ser, Hidróxido de Cálcio, utilizado como medicação intracanal entre sessões em dentes com polpa necrosada e lesão periapical visível radiograficamente. Um dado importante neste estudo foi a presença de tecido mineralizado próximo ao forame apical nas amostras em que o Hidróxido de Cálcio fora usado como medicação intracanal por 30 dias. É sabido que para se ter mineralização é preciso ausência de bactérias e seus subprodutos!

Jiang *et al* (2003) determinaram os efeitos diretos do lipopolissacarídeo na

osteoclastogenese e a habilidade do hidróxido de cálcio em inibir a formação de osteoclastos estimulado pelo LPS. Células derivadas de macrófagos e monocitos de ratos leucemicos foram cultivados com receptor combinante RANKL por 72 horas. Quando o RANKL foi removido a células foram tratadas com concentrações diferentes de LPS, e posteriormente com hidróxido de cálcio por 48 horas. As células foram fixadas e coradas e analisadas através de análises histoquímicas para se detectar células multinucleadas que expressem atividade acida fosfatase. Como resultados o LPS induziu a formação de células osteoclasticas quando essas foram pre tratadas por 72 horas com RANKL. O hidróxido de cálcio diminui significativamente a habilidade do LPS em estimular a formação de osteoclastos. Conclui-se que o LPS estimula diretamente a formação de osteoclastos. A inativação do LPS pelo hidróxido de cálcio reduziu significativamente essa atividade.

Tanomaru *et al* (2003) avaliaram o efeito do preparo biomecanico com diferentes soluções irrigadoras e com hidroxido de calcio como medicação intracanal em dentes de caes contendo endotoxina bacteriana. Cento e quarenta dentes unirradiculares de 7 caes foram divididos em 7 grupos de 20 dentes cada. Os animais foram anestesiados, os dentes foram isolados e superficie coronaria e adjacentes foram desinfectadas previamente. Canais radiculares foram acessados, o comprimento de trabalho determinado a 2mm aquem do apice radiografico. A polpa foi removida e o canal radicular foi irrigado com 3,6ml de solução salina após cada troca de instrumento. O forame apical (2 mm além do comprimento de trabalho) foi alargado com limas tipo K de diametro 20, 25 e 30 a fim de padronizar seu diametro permitindo uma comparação analitica alem de ampliar o contato do LPS com tecidos periapicais adjacentes. O preparo apical foi finalizado em diametro 40. Irrigação com 3,6 ml de solução salina após cada troca de intrumento foi realizada. Um instrumento tipo K de diametro 30 foi utilizado para patencia foraminal. Os canais radiculares foram aspirados, secados com pontas de papel absorvente esterlizadas e preenchidos com EDTA por 3 minutos com agitação. Os canais radiculares foram novamente lavados com 3,6 ml de solução salina, secados e preenchidos com solução de LPS. Selamento coronario foi feito com bolinha de algodão esteril e cimento a base de oxido de zindo e eugenol. Após 10 dias, os animais foram novamente anestesiados, dentes isolados e o selamento temporario removido. Os 140 dentes foram divididos em 7 grupos de 20 dentes de acordo com a solução irigadora utilizada: hipoclorito de sodio 1%, hipoclorito de sodio 2,5%, hipoclorito de sodio a 5%,

digluconato de clorexidina 2%, solução salina, sem irrigante nenhum e solução salina durante preparo biomecânico + hidróxido de cálcio como medicação intracanal durante o período do experimento. O preparo biomecânico dos canais radiculares foi completado com instrumentos de diâmetro 45 a 70, utilizando-se 3,6 ml da solução irrigadora escolhida para cada caso. Os dentes foram selados com cimento ionômico de vidro. Após 60 dias, animais foram sacrificados e a mandíbula e maxila foram seccionadas a fim de se obter raízes individuais. As amostras foram lavadas e desmineralizadas com EDTA em micro-ondas. As amostras foram lavadas em água corrente, desidratadas em contato com álcool, fixadas em xilol e embebidas em blocos de parafina. Seções de 6 µm foram coradas em hematoxilina eosina e Mallory para análise histopatológica. Para o grupo que utilizou o irrigante hipoclorito de sódio 1%, houve severos danos teciduais. Na superfície do cimento, havia áreas de reabsorção não cicatrizada e cementoblastos estavam ausentes. Áreas extensas de necrose tecidual. Infiltrado inflamatório misto e difuso na região periapical, com edema generalizado. Osteoclastos foram encontrados em osso alveolar indicando aumento reabsorção óssea. Para o grupo que utilizou o irrigante hipoclorito de sódio 2,5%, alteração similar ao primeiro grupo em 19 amostras, com inflamação moderada e severa, reabsorção óssea e cementária ativa, congestão vascular, necrose. O infiltrado inflamatório misto era severo em 11 casos, moderado em 5 casos e leve em 3 casos. Quinze amostras tinham reabsorção cementária e 19 tinham reabsorção óssea com considerável quantidade de osteoclastos. Para o grupo que utilizou o irrigante hipoclorito de sódio 5%, áreas de tecido conectivo necrosado, edema, hemorragia, células inflamatórias mononucleares em área periapical. A reação inflamatória foi considerada leve em 7 casos, moderada em 6 e intensa em 6 casos. Intensa proliferação vascular e congestão além de áreas hemorrágicas. A superfície apical do cimento apresentou áreas de reabsorção e ausência de cementoblastos em 14 casos. Reabsorção óssea alveolar ativa e profusão de osteoclastos em 17 casos. Para o grupo que utilizou o irrigante clorexidina 2%, em 13 amostras, a superfície do cimento estava irregular em decorrência de reabsorção. O tecido intersticial apresentou áreas de necrose e células inflamatórias mononucleares. Proliferação e congestão vascular. O infiltrado inflamatório misto estava distante do forame apical com predominância de macrófagos. Osteoclastos presentes no osso alveolar em 18 casos. Para o grupo que utilizou o irrigante solução salina, severas alterações periapicais em todos os parâmetros, em todas as amostras. Para o grupo que manteve o LPS dentro do canal radicular sem o uso de irrigantes e sem preparo biomecânico, severas alterações periapicais. Para o grupo que utilizou medicação

intracanal de hidróxido de cálcio, as alterações periapicais foram consideradas suaves em 16 casos, moderado em 2 e severo em 2 casos. O espaço do ligamento periodontal foi considerado normal em 16 raízes, moderado em 2 e muito aumentado em 2 casos. Houve reabsorção de cimento em áreas próximas ao forame apical. Nenhuma atividade de reabsorção óssea alveolar foi constatada e havia osteoblastos na superfície radicular. Somente 3 casos apresentaram reabsorção óssea alveolar. Como conclusão, o preparo biomecânico com diferentes soluções irrigadoras não pode inativar os efeitos da endotoxina, porém, o hidróxido de cálcio como medicação intracanal pareceu inativar os efeitos induzidos pela endotoxina *in vivo*.

Silva *et al* (2004) analisaram histologicamente o efeito de alguns irrigantes sobre a endotoxina bacteriana em dentes de cães preenchidos com LPS após a pulpectomia. Os segundos, terceiros e quartos pré molares inferiores, e segundos e terceiros pré molares superiores de 6 cães foram selecionados obtendo-se um total de 12 raízes que foram divididas em 6 grupos de 20 raízes cada. Os animais foram anestesiados e radiografias periapicais foram tiradas inicialmente e após 30 e 60 dias de tratamento. Os dentes foram isolados e a coroa e áreas adjacentes foram desinfetadas previamente. O comprimento de trabalho foi determinado em 2mm aquém do ápice radiográfico utilizando limas do tipo K. A polpa foi removida e o canal radicular foi irrigado com solução salina após cada troca de instrumento. O forame apical foi alargado com instrumentos do tipo K de diâmetros 20, 25, 30 no nível do ápice radiográfico. O preparo mecânico foi conduzido com limas tipo K no comprimento de trabalho estabelecido até o instrumento 40. O instrumento do tipo K diâmetro 30 foi usado para se manter patência. Os canais radiculares foram então aspirados e secados com pontas de papel estéreis e preenchidos com EDTA por 3 minutos com agitação. Os canais foram lavados com solução salina, novamente secados, e finalmente preenchidos com uma solução aquosa de LPS da *E.coli*, as aberturas coronárias foram seladas com uma bolinha de algodão estéril e cimento a base de óxido de zinco e eugenol. Após 10 dias os animais foram novamente anestesiados e os dentes foram isolados e divididos nos 6 grupos conforme as soluções irrigadoras que receberam: grupo 1 sem irrigação; grupo 2 solução salina; grupo 3 hipoclorito de sódio 1%; grupo 4 hipoclorito de sódio 2,5 %; hipoclorito de sódio 5%, grupo 6 digluconato de clorexidina 2%. O preparo mecânico foi completado com instrumentos tipo K de diâmetro de 45 a 70 no comprimento de trabalho recebendo a solução respectiva para cada grupo. O acesso coronário foi selado com cimento ionômero de vidro e amalgama de prata. Após 60 dias

os dentes foram novamente radiografados, os animais foram mortos com overdose anestésica e mandíbula e maxila foram removidos, dissecados e seccionados afim de se obter raízes individuais. As amostras foram lavadas e desmineralizadas com edta em um micro-ondas. As amostras foram lavadas em água corrente, desidratadas com álcool, fixadas em xilol e embebidas em blocos de parafina. Seções seriadas de 6- um, foram coradas com hematoxilina e eosina e coloração de Mallory para análise histopatológica. A coloração de Brown-brenn foi utilizada para diferenciar bactérias gram positivas e gram negativas mostrando que não havia contaminação em nenhum grupo. Como resultados o grupo 1 mostrou severas mudanças na região apical e periapical. No terço apical havia lacunas de cimento que estavam vazias ou preenchidas com tecido necrosado. Presença de células inflamatórias e sangramento foi constatada, o tecido intersticial invaginado do periodonto era composto em sua maioria de fibras desarranjadas, com sangramento e infiltrado inflamatório de células mononucleares e neutrófilos. Havia reabsorção de cimento ao redor do forame. O ligamento periodontal mostrou um concentrado inflamatório próximo e distante do forame apical. Reabsorção alveolar ativa com presença de osteoclastos pode ser observado. No grupo 2 foi observado uma grande quantidade de tecido intersticial denso, edema generalizado e necrose tecidual na região apical, reabsorção de cimento ativa foi observada em 17 amostras. No ligamento periodontal infiltrado inflamatório era intenso e predominantemente mononuclear. Havia uma concentração maior de neutrofilos ao redor do forame. Macrófagos e proliferação vascular estavam distantes do forame apical. Osteoclastos também puderam ser observados indicando reabsorção óssea ativa. No grupo 3 e grupo 4 houveram severas mudanças da região apical e periapical, semelhantes aos grupos 1 e 2. No grupo 5 foi observado um infiltrado inflamatório difuso e moderado na região de periapice com neutrófilos, edema e sangramento no tecido intersticial. Havia áreas de reabsorção de cimento e ausência de cementoblastos em 8 raízes distante do forame foi observado células inflamatórias mononucleares e discreta presença de matriz colágena. Reabsorção ativa do osso alveolar foi constatada em 17 amostras. Para o grupo 6 as lacunas de cimento estavam vazias ou preenchidas com células inflamatórias o tecido intersticial apresentava áreas de necrose e células inflamatórias mononucleares. Havia um infiltrado inflamatório misto e moderado próximo ao forame apical em 10 raízes, infiltrado intenso em 5 raízes e infiltrado leve em 5 raízes. A distância, infiltrado inflamatório misto com predominância de macrófagos. O osso alveolar apresentava osteoclastos sobre sua superfície. Conclui-se que o infiltrado inflamatório foi menos intenso nos grupos cujos os canais radiculares

foram irrigados com solução de hipoclorito de sódio a 5% e clorexidina a 2%. Contudo nenhuma das soluções irrigadoras inativou completamente o efeitos deletérios do LPS. O preparo biomecânico associado a diferentes soluções irrigadoras não inativou completamente a endotoxina. A endotoxina é capaz de penetrar na dentina em até 0,5mm. Acredita-se que o preparo mecânico leva a uma eliminação de uma quantidade considerável de LPS do interior no canal radicular. Entretanto constatou-se que nenhuma das soluções irrigadoras usadas (solução salina, hipoclorito de sódio 2,5 e 5 %, clorexidina 2%) teve efetividade total na eliminação da endotoxina na região periapical.

Hong *et al* (2004) avaliaram o papel do lipopolissacarídeo nas reabsorções ósseas infecciosas das lesões periapicais. Polimixina B um específico inibidor de LPS foi avaliado para o tratamento da lesão periapical. Solução de LPS purificada das bactérias anaeróbicas gram – comumente presente em lesões periapicais *Fusobacterium nucleatum* e *P. endodontalis* foi extraída para ser utilizada neste trabalho. A solução de LPS estimulou a cultura de macrófagos de ratos a liberar interleucina 1A e fator de necrose tumoral. A polimixina B inibiu esses dois efeitos significativamente. O LPS também estimulou o gene da liberação da matriz metaloproteinase e de anticorpos anti interleucina 1 e anti fator de necrose tumoral. A polimixina B também diminuiu esse efeito. Um modelo de doença periapical foi estabelecido em ratos Wistar. A administração de Polimixina B reduziu a extensão da lesão associada a reabsorção óssea, reduzindo também a concentração de metaloproteinase produzida pelos macrófagos. Como conclusão, fica estabelecido que o LPS liberado nos casos de infecção endodôntica funciona como um gatilho para síntese de interleucina 1A e fator de necrose tumoral dos macrófagos. Essas citocinas pró inflamatórias regulam a produção de metaloproteinase dos macrófagos, promovendo a reabsorção óssea periapical.

Oliveira *et al* (2005) avaliaram os efeitos de medicamentos intracanal sobre a endotoxina no sistema de canais radiculares. Setenta e cinco incisivos centrais e laterais superiores recém extraídos foram utilizados neste trabalho. A seleção dos dentes foi feita baseado em morfologia e dimensões similares. Debris, cálculos e remanescentes teciduais foram removidos com cureta de Gracey e os dentes foram armazenados em solução salina de cloreto de sódio a 0,85%. Os 3 mm apicais foram seccionados transversalmente e a porção coronária também foi seccionada a fim de estandarizar o comprimento radicular em 14 mm. O comprimento de trabalho foi definido a 1 mm aquém

desta medida. Canais foram preparados até instrumento de diametro 50. Preparo foi realizado com solução irrigadora de hipoclorito de sodio a 1% apos cada recapitulação. Acesso radicular foi feito atraves do uso de brocas de Gates Glidden. Os canais foram secos com pontas de papel absorvente esterilizadas e a região apical foi selada com composito resinoso fotopolimerizavel. A superficie externa das raizes foi recoberta com uma camada de adesivo epóxico exceto o acesso cervical ao canal radicular. As raizes foram esterilizadas em autoclave e randomicamente dispostas em 5 placas de cultura de agar com 15 dentes cada. Todas as amostras e todos os materias foram expostos a radiação gamma para eliminação de LPS pre existente. Uma solução aquosa contendo LPS da bacteria *E coli* foi inoculada dentro dos canais radiculares das 60 amostras usando uma micropipeta. Dentes foram selados com uma bolinha de algodão esterilizada e os frasco de cultura com agar foram fechados e mantidos por 24 horas a uma temperatura de 37°C em atmosfera umidificada. Após 24 horas, selamento cervical foi removido e o lumem do canal radicular foi preenchido com medicação intracanal. As 75 amostras foram divididas em 5 grupos de acordo com o medicamento que receberam: hidroxido de calcio, solução de polimixina B, otosporin, grupo controle positivo sem medicamento e grupo controle negativo sem endotoxina e sem medicamento. As amostras foram seladas novamente com uma bolinha de algodão esteril e incubados novamente por 7 dias. Após esse periodo, os canais radiculares foram irrigados com 3 ml de agua esterilizada e secos com pontas e papel absorvente esterilizadas. Cada amostra foi preenchida com agua esterilizada e o conteudo intracanal foi coletado com uma seringa plastica esteril. A avaliação da inativação da endotoxina foi feita pela análise Limulus Amebocyte Lysate que consiste em um preparado a partir de amebocitos circulantes do caranguejo rei, *Limulus polyphemus*. Quando exposto a pequenas quantidades de endotoxina, ocorre a lise desses amebocitos e há aumento da opacidade e viscosidade do preparado formando um gel espesso, que permite sua manipulação sem desintegração. Isso é considerado um fator positivo para presença de LPS. Gel com consistencia mais mole, de coloração mis turva, aumento na viscosidade, liquido transrente são considerados testes negativos. A avaliação de inativação da endotoxina também é feita atraves de analise da produção de anticorpos em cultura de linfocitos B. Como resultados, não houve formação de gel para os grupos do hidroxido de calcio e o controle negativo. Tres amostras do grupo de polimixina B e demais grupos apresentaram formação de gel, ou seja, positivo para presença de LPS. A estimulação de anticorpos pelos linfocitos B foi menor para o gruposdo hidroxido de calcio e polimixina B. Demais

grupos induziram um aumento significativo na produção de anticorpos. Portanto tanto o hidróxido de cálcio quanto a polimicina B são capazes de inativar o LPS, alterando a capacidade da endotoxina em estimular a produção de anticorpos pelos B linfócitos. A combinação meomicina-polimixina-hidrocortisona, o otosporin, não foi capaz de inativar a endotoxina.

Nair (2006) fez uma revisão literária a respeito das causas da periodontite apical persistente e demonstrou que existem 6 fatores biológicos que levam a radiolucidez assintomática persistente após o tratamento endodôntico. Eles são: 1) infecção intraradicular persistente no complexo sistema de canais radiculares; 2) infecção extraradicular geralmente na forma de actinomicose periapical; 3) ejeção de material obturador ou outros materiais exógenos que causam reação de corpo estranho; 4) acúmulo de cristais de colesterol endógenos que irritam o tecido periapical; 5) cistos verdadeiros; 6) tecido de granulação como reparo da lesão.

Wu *et al* (2006), estudaram as consequências e estratégias de intervenção de infecção residual pós tratamento endodôntico. Amostras de bactérias tiradas de canais radiculares tratados são usadas para se determinar a presença e características da microbiota recente. Entretanto, essa técnica permite apenas a identificação de microrganismos presentes no canal radicular principal e pouco é pouco provável que ela consiga coletar amostras viáveis de áreas além do terço apical do preparo e obturação, ou em canais laterais, ramificações, istmos e tubulos dentinários. É impossível a partir de técnicas atuais a identificação de infecção residual no sistema de canais radiculares após o preparo. Em observações histológicas de terços apicais, bactérias foram encontradas em istmos inacessíveis e canais acessórios, frequentemente sob forma de biofilmes. Não há evidência *in vivo* que suporta a afirmativa de que essas bactérias possam ser sepultadas efetivamente através da obturação se tornando algo inofensivo. Como consequência dessa infecção radicular residual, a periodontite apical pós tratamento, que pode ser radiograficamente não detectável, pode persistir ou desenvolver-se como um mecanismo de defesa para impedir a dissociação sistêmica de bactérias e seus subprodutos pelo corpo. Se o objetivo do tratamento endodôntico é eliminar a periodontite apical a um nível histológico, o tratamento atual é inadequado. Doença periapical pós tratamento endodôntico é frequentemente associado a procedimentos de baixa qualidade que não eliminam a infecção intracanal. Porém, a infecção persistente em áreas

inacessíveis ou infecção extraradicular causada por ejeção de debris contaminados por exemplo, cistos verdadeiros, reação de corpo estranho irão requerir intervenção cirurgica. Procedimentos comuns inerentes ao tratamento endodontico são inúteis frente a complexa morfologia do sistema de canis radiculares e muitas raízes tem áreas inacessíveis como ramificações, istmos e outras irregularidades, onde bactérias podem estar presentes sob a forma de biofilme.

Vianna *et al* (2007) conduziram um estudo a fim de determinar a quantidade de endotoxina (lipopolissacarideo) e bactérias em dentes necrosados humanos antes e após preparo químico mecânico com clorexidina gel como substância auxiliar de irrigação e como medicação intracanal por 7 dias. Vinte e quatro pacientes que necessitavam de tratamento endodontico foram selecionados. A média de idade era de 18 a 65 anos. Os dentes selecionados eram unirradiculares, com polpa necrosada e evidencia radiografica de periodontite apical. Nenhum dos pacientes mostrou sinais e sintomas clinicos de origem endodontica. Uma anamnese detalha foi obtida de cada paciente. Pacientes que receberam antibioticoterapia 3 meses antes do experimento ou que tiveram alguma doença sistêmica neste periodo foram descartados do estudo. Os dentes foram isolados, coroa e superficie adjacente foram desinfetados com solução de agua oxigenada a 30% por 30 segundos + solução de hipoclorito de sodio a 2,5% por 30 segundos + inativação de agentes desinfetantes tiosulfato de sodio 5%. Cavidade de acesso foi realizada usando broca diamantada esteril em alta rotação. Antes do acesso, a camara pulpar, essa foi novamente desinfetada nos moldes descritos anteriormente. A camara pulpar foi acessada e lavada com solução salina esteril. As amostras iniciais foram coletadas com 5 pontas de papel absorvente estereis, posicionadas no interior do canal radicular em todo seu comprimento (calculado através de radiografia pre operatoria). Uma ponta de papel foi submetida a analise cromogenica LAL e demais submetidas a cultura. Todas as demais amostras foram coletadas desta mesma maneira. Após a primeira coleta de amostras com pontas de papel absorvente, a camara pulpar foi limpa com clorexidina gel 2% e instrumentos de diametro 10 ou 15 limpam toda a extensão do canal radicular (medida calculada através de radiografia inicial). Acesso radicular foi realizado utilizando instrumentos GT e Gates Glidden. O comprimento de trabalho considerado ideal (1 mm aquém de apice radiografico) foi checado com uma radiografia com o instrumento na medida do comprimento de trabalho confirmado pelo localizador foraminal eletrônico. O preparo apical for realizado com até 3 instrumentos a partir do intrumento apical inicial.

Escalonamento reverso foi realizado com até 3 instrumentos de diâmetro maior que o instrumento apical final. Os 24 dentes foram tratados com solução de clorexidina gel a 2% imediatamente após o uso de cada instrumento. O tempo de trabalho para finalizar o preparo biomecânico foi de em média 20 minutos para cada dente. 4 ml de solução salina + 5 ml de Tween 80 associado com lecitina 0,07% por 1 minuto foram utilizados para rinsagem final antes da coleta da segunda amostra. Os canais foram lavados com solução salina fisiológica e secados com ponta de papel absorvente esteril; e foram divididos randomicamente em grupos conforme a medicação intracanal usada: pasta de hidróxido de cálcio, clorexidina gel 2%, pasta de hidróxido de cálcio + clorexidina gel 2%. Dentes foram selados com Cavit e Resina composta. Sete dias depois, os canais foram novamente acessados de forma aséptica, os medicamentos foram removidos com rinsagem de 5 ml de Tween 80 + lecitina 0,07% para clorexidina e 5 ml de ácido cítrico para hidróxido de cálcio. A última amostra foi coletada. Nas amostras iniciais, bactérias e endotoxina estavam presentes em todos os 24 casos. Bactérias em sua maioria anaeróbias restritas. Nas amostras após preparo químico mecânico, a endotoxina estava presente em todos os 24 casos, enquanto que bactérias estavam presentes em 8 casos. A concentração de endotoxina e quantidade de bactérias decaíram significativamente que em comparação com as amostras iniciais. Nas amostras após 7 dias, endotoxina estava presente em todos os 24 casos e bactérias presentes em 13 casos. A concentração de endotoxina decaiu suavemente em comparação com a segunda amostra. E o número de bactérias aumentou um pouco. A explicação para isto é que bactérias remanescentes ao preparo penetraram nos tubulos dentinários e sobreviveram lá, sendo capazes de recolonizar o canal principal no período de 7 dias. Ou seja, diferenças estatísticas pronunciadas entre as amostras iniciais e pós preparo foram encontradas. Enquanto que não houveram diferenças significantes entre as amostras pós preparo e pós medicação intracanal por 7 dias. Como conclusão, a endotoxina foi parcialmente removida após o preparo químico mecânico, embora uma grande redução do número de bactérias foi alcançado. Uma diminuição significativa não foi alcançada com a inclusão de curativos de demora por 7 dias. E não houve diferenças relevantes entre as diferentes substâncias usadas no curativo de demora (hidróxido de cálcio, clorexidina gel ou associação dos dois). A quantidade de endotoxina não foi reduzida significativamente quando o hidróxido de cálcio foi usado como medicação intracanal, embora essa substância tem sido apresentada como mais efetiva (BUCK et al., 2001). O benefício da inclusão de curativos de demora é questionável! O estudo focou em casos assintomáticos no qual bactérias

gram – geralmente são menos dominantes que em pacientes sintomáticos (GOMES et al. 2004; JACINTO et al., 2003). As bactérias gram – encontradas neste estudo foram *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Porphyromonas* e *Capnocytophaga*. Isso se manteve nas amostras iniciais e pós preparo, embora o número viável de células foi drasticamente reduzido nas amostras após o preparo biomecânico. O preparo químico mecânico foi responsável pela maior redução na quantidade de endotoxina, provavelmente em decorrência da remoção de debris do interior do canal radicular durante preparo e modelagem além do uso de substância auxiliar de irrigação. A concentração de endotoxina não reduziu de maneira significativa quando foi usado clorexidina gel 2% ou hidróxido de cálcio nos curativos de demora por 7 dias, muito menos nas amostras que foram tratadas associando-se os dois medicamentos. Em todas as amostras, as iniciais, a pós preparo e pós medicação intracanal, cepas gram + foram encontradas. Antes do tratamento, nas amostras iniciais, as bactérias mais comumente encontradas foram *Propionibacterium acnes*, *Gemella morbillorum*, *Actinomyces naeslundii*, *Eubacterium lentum*, *Propionibacterium propionicum*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Actinomyces viscosus*, *Eubacterium limosum*. Após o preparo biomecânico, as cepas gram + mais comumente encontradas foram *P. Acnes* e *P. Propionicum*. Após 7 dias de medicação intracanal, o número de cepas de bactérias gram + reduziu e as espécies encontradas foram *P. Acnes*, *Clostridium argentinense*, *Actinomyces meyeri*, *A. Naeslundii*, *Bifidobacterium spp.* e *G. Morbillorum*. Bactérias gram + são frequentemente encontradas em casos de polpa necrosada, entretanto somente algumas espécies desse grupo de organismos está diretamente relacionada ao desenvolvimento de periodontite apical (PINHEIRO et al., 2003; SJOGREN et al., 1988). Bactérias gram + não contêm LPS e seu papel no desenvolvimento de lesões periapicais ainda não está bem definido. Outros componentes de sua parede celular como ácido lipoteico e mureína (peptidoglicano) podem estimular a reabsorção óssea (DEWHIRT, 1982; HAUSMANN et al., 1975). Mecanismos pelo qual bactérias gram + sobrevivem no interior do canal radicular após preparo químico mecânico ou a medicação intracanal podem ser determinados pelas interações com outras bactérias (SANT'ANNA et al., 2000). Neste estudo, foi constatado interações entre *Propionibacterium spp.* e *Clostridium spp.*, *Propionibacterium spp.* e *Fusobacterium spp.*, *E. Lentum* e *F. Nucleatum*, *Clostridium spp.* e *G. Morbillorum*. Bactérias gram + podem sobreviver no tecido periapical fora do canal radicular como *A. meyerii* and *P. Propionicum* (HAPPONEN et al., 1986; SJOGREN et al., 1988).

Coon *et al* (2007) determinaram o papel da prostaglandina E2 mediada pela COX2 na síntese de formação de osteoclastos durante a resposta a um patógeno endodôntico. A prostaglandina E2 é um importante mediador inflamatório que desempenha um papel essencial no desenvolvimento e progressão das doenças perirradiculares. A cicloxigenase 2 ou COX 2 é uma enzima induzível responsável pelo aumento dos níveis de prostaglandinas E2 durante a inflamação e em outros processos patológicos. Culturas de osteoblastos primários e culturas de osteoclastos foram preparadas. Essas culturas celulares foram expostas ao LPS, a materiais obturadores como guta percha, Resilon, MTA, AHPLUS. A formação de osteoclastos foi analisada utilizando-se a coloração TRAP. A expressão do receptor ligante RANKL foi determinada pela análise PCR (reação em cadeia da polimerase). A exposição aos materiais endodônticos não causou formação de osteoclastos. O LPS e os materiais endodônticos causaram uma diminuição na expressão de RANKL. Assim a prostaglandina E2 mediada pela COX2 é necessária para a reabsorção óssea inflamatória induzida pelo LPS, bem como a manutenção de níveis basais da expressão de RANKL. A formação de osteoclastos induzida pelo LPS pode ser independente da via RANKL.

De Oliveira *et al* (2007) avaliaram *in vitro* os efeitos dos irrigantes endodônticos sobre a endotoxina bacteriana nos canais radiculares. Noventa e oito dentes unirradiculares recentemente extraídos foram utilizados neste estudo. Os 3 mm finais da raiz – o terço apical- foram seccionados transversalmente com um disco diamantado resfriado a água e a coroa foi seccionada em um ponto a fim de estandarizar o comprimento radicular para todos os casos em aproximadamente 14mm. O comprimento de trabalho foi determinado subtraindo 1 mm dessa medida. As amostras foram esterilizadas em autoclave. Uma solução com endotoxina de *E coli* foi inoculada no canal radicular de 84 amostras usando uma micropipeta. Os dentes foram selados com uma bolinha de algodão esteril e os recipientes de vidro contendo os dentes foram fechados e incubados por 24 horas a 37 C em atmosfera umidificada. Após 24 horas, os canais radiculares foram novamente abertos e instrumentados até instrumento de diâmetro 80. Escalonamento reverso, recapitulação e irrigação com 3 ml de solução irrigadora foi utilizada. As amostras foram divididas em 7 grupos de acordo com o irrigante utilizado: hipoclorito de sódio 2,5%, hipoclorito de sódio 5,25%, digluconato de clorexidina 2%, solução de hidróxido de cálcio 0,14%, polimixina B, solução salina esteril. Após o uso do

irrigante, foi feita rinsagem final com 3 ml de água esterilizada. Cada amostra foi preenchida com água esteril e o conteúdo do canal radicular foi coletado: uma primeira amostragem foi sugada com uma seringa plástica esteril imediatamente após a instrumentação e após 7 dias, para se avaliar a inativação da endotoxina. Foram utilizados dois métodos de análise: Limulus Amebocyte Lysate e produção de anticorpos em cultura de linfócitos B. A irrigação do canal radicular com solução de Hidróxido de Cálcio a 0,14% ou com Polimixina B reduziu significativamente a quantidade de endotoxina em comparação com demais soluções utilizadas para este estudo (Hipoclorito de Sódio e Clorexidina) e alterou as propriedades do LPS em estimular a produção de anticorpos pelos B linfócitos. Porém, uma pequena quantidade de LPS foi detectada em amostras após 7 dias. A presença dessa pequena quantidade de endotoxina ocorreu porque apesar da solução de Hidróxido de Cálcio e Polimixina B serem efetivos contra o LPS, eles não penetram o suficiente nos tubos dentinários para alcançar o lipopolissacarídeo que esteja isolado mais profundamente. O estudo sugere que apesar de Hidróxido de Cálcio e Polimixina B apresentarem ação importante sobre o LPS, a irrigação não foi efetiva para dentro dos tubos. Hipoclorito de sódio e clorexidina não inativaram a endotoxina.

Da Silva *et al* (2008) realizaram uma avaliação radiográfica quantitativa de reabsorção óssea periapical em dentes de cães contaminados com endotoxina bacteriana, associados ou não ao Hidróxido de Cálcio. Os segundos, terceiros e quartos pré-molares inferiores e os segundos e terceiros pré-molares superiores de 3 cães, de idade entre 12-18 meses e peso 8-15 kg foram selecionados, totalizando 60 canais radiculares. Vinte raízes foram separadas para cada um dos grupos experimentais 1 e 2 e dez raízes foram separadas para os grupos controle 3 e 4. Os dentes foram aleatoriamente distribuídos ao longo dos grupos. Os animais foram anestesiados via endovenosa com sódio tiopental e radiografias iniciais foram tiradas. Após isolamento absoluto e desinfecção de campo operatório com clorexidina a 2%, o acesso coronário foi feito. O comprimento de trabalho foi determinado a 2 mm além do ápice radiográfico usando o instrumento 30 tipo K. A polpa radicular foi removida e o canal radicular irrigado com no mínimo 3,6 ml de solução salina. O instrumento de máxima lima apical foi de diâmetro nominal 50 tipo K. O instrumento 30 tipo K foi utilizado como instrumento de patência. Após instrumentação, os canais foram secos através de aspiração e pontas de papel absorvente, foram preenchidos com EDTA por 3 minutos e então irrigados com

solução salina e secos novamente. Para o Grupo 1, 20 canais foram preenchidos com solução aquosa contendo LPS; para o Grupo 2, 20 canais foram preenchidos com solução aquosa de LPS + Hidróxido de Cálcio em suspensão; para o Grupo 3, 10 canais foram preenchidos com solução salina. As câmaras pulpares foram seladas com bolinha de algodão esteril + cimento a base de óxido de zinco e eugenol por um período de 30 dias. Para o grupo 4, 10 canais foram expostos ao ambiente oral por 5 dias, permitindo contaminação microbiana. Sob anestesia, as câmaras pulpares foram limpas dos debrís e seladas com uma bolinha de algodão e cimento a base de óxido de zinco e eugenol induzindo assim a periodontite apical crônica. Novas radiografias foram tiradas 30 dias depois após o selamento. Para cada par de radiografia (inicial e pós 30 dias), as áreas de radiolucidez, quando presentes, foram demarcadas e medidas por 3 examinadores calibrados, a fim de excluir imagens referentes a anatomia dental em particular. Os examinadores eram cegos para os grupos de dentes a qual pertenciam. As 20 raízes do grupo 1 (LPS) apresentaram radiolucidez visível, com perda da integridade de lamina dura e áreas circunscritas extensas de reabsorção óssea periapical. Para o grupo 2 e 3, a lamina dura estava intacta e não havia áreas de radiolucidez (reabsorção óssea) nas 20 raízes destes grupos (LPS + Hidróxido de Cálcio e solução salina). Para o grupo 4, periodontite apical visível em todas as raízes, com perda de integridade de lamina dura e áreas difusas de reabsorção óssea. Assim, observou-se que o hidróxido de cálcio pareceu preservar a lamina dura e evitar a ocorrência de reabsorção óssea após 30 dias como medicação intracanal em dentes de cães com LPS. O grupo controle que recebeu LPS somente, apresentou periodontite apical visível radiograficamente, com perda da integridade da lamina dura e extensiva área circunscrita de reabsorção óssea. Os resultados obtidos aqui estão de acordo com outros trabalhos em diversos modelos animais (DAHLEN *et al.*, 1981; PITTS *et al.*, 1982; MATTISON *et al.*, 1987). Para o grupo em que a lesão foi induzida experimentalmente sem o tratamento endodôntico e sem injeção de LPS, esta apareceu radiograficamente menor. Isso se deve ao fato de que a formação da lesão foi causada pelas bactérias e seus subprodutos tais como hialuronidase, colagenase, que agem dissociando as fibras e matriz de colágeno. No grupo com LPS inoculado, as lesões foram maiores em decorrência da possibilidade de o LPS ter se aderido a tecidos mineralizados causando reabsorção mais extensa. O Hidróxido de Cálcio foi capaz de inativar o LPS bacteriano e por isso, deve ser a medicação intracanal de escolha em dentes com polpa necrosada e periodontite apical.

Ricucci *et al* (2008) relataram um caso de actinomicose extraradicular que claramente formou uma ligação com a infecção intraradicular. Análise histopatológica e histobacteriológica da amostra do terço apical radicular e da lesão periapical anexada a este terço foram obtidas a partir de cirurgia de um dente com lesão persistente e tratamento endodôntico concluído. Embora nenhuma bactéria pudesse ser observada na amostra do terço apical do canal radicular, as ramificações do terço apical estavam forradas com uma camada densa de biofilme bacteriano que era contígua aos agregados de actinomicose extraradicular. Assim, não há evidência clara de que a actinomicose apical é uma entidade independente que leva sozinha à manutenção da periodontite apical. Não houve evidência de bactérias vivas dentro do canal radicular principal. Mesmo após o preparo químico mecânico e aplicação de pasta de hidróxido de cálcio por um período total de 35 dias, bactérias persistiram nas ramificações e mantiveram a infecção extraradicular. As bactérias localizadas nas ramificações, istmos, tubulos dentinários são capazes de escapar dos efeitos dos instrumentos e dos irrigantes. A falha da medicação intracanal de hidróxido de cálcio em eliminar as bactérias das ramificações se deve ao fato de sua baixa solubilidade e inativação pela dentina, fluidos teciduais, matéria orgânica que podem alterar o pH da pasta, importante para seus efeitos antimicrobianos (SIQUEIRA *et al.*, 1999; HAAPASALO *et al.*, 2007). Se o conceito de que actinomicose extraradicular é dependente de infecção intraradicular for verdadeiro, é justo especular que a eliminação do componente irritante intraradicular seja suficiente para que a cura periapical ocorra. A busca por um protocolo de atendimento com diferentes medicações deve ser encorajada. A maioria das lesões persistentes causadas por actinomicose extraradicular tem sido tratada com sucesso através de cirurgia ou exodontia. Além disso, o tratamento com antibióticos não parece ser muito plausível já que ele não deve alcançar a porção apical necrótica do canal radicular a níveis importantes para se tornar efetivo. A ocorrência de infecção persistente pode exigir corte da ponta radicular e curetagem da lesão para se remover os componentes da infecção tanto intra quanto extraradiculares.

Rocha *et al* (2008) avaliaram, através da microscopia eletrônica de varredura, a presença de biofilme na superfície externa do terço apical de dentes descíduos humanos com polpa vital e necrosada, com e sem evidência radiográfica de patologia perirradicular. Dezoito dentes extraídos foram selecionados e separados em grupos. No grupo 1, 5 dentes que tinham polpa vital, grupo 2, 7 dentes que tinham polpa necrosada sem

evidencia radiografica de lesão periapical e grupo 3, 6 dentes que tinham polpa necrosada e evidencia radiografica de lesão periapical. Os dentes foram previamente lavados com solução salina e imersos em solução de tripsina por 20 minutos. Os dentes foram seccionados, desidratados em etanol, secados com gas carbonico, sputter coated com ouro e a superficie externa do terço apical radicular examinado atravem do microscopio eletronico de varredura. Nos grupos de dentes com polpa normal e com polpa necrosada sem evidencia radiografica de lesão periapical, a superficie radicular estava coberta de fibras colagenas sem evidencia de bacterias. Essas fibras colagenas estavam arranjadas em diferentes direções. No grupo de dentes com polpa necrosada e evidencia de lesão periapical, as superficies radiculares de todas as amostras não apresentavam fibras colagenas mas revelaram areas reabsorvidas contendo micro-organismos (cocos, bacilos, filamentosas e espiroquetas). Como conclusão, micro-organismos organizados em bofilmes na superficie externa da raiz (infecção extraradicular) foram detectados em dentes com polpa necrosada e petogenia periapical visivel radiograficamente. Esses achados não estão de acordo com LOPES e SIQUEIRA (2001), que relataram que a ocorrencia de infecção extraradicular não é comum em dentes permanentes não obturados. A diferença pode ser esclarecida aqui pois os dentes estudados foram imersos em tripsina após a extração, o que facilita a identificação de micro-organismos.

Martinho *et al* (2008) conduziram um estudo clinico para quantificar endotoxina e bacterias cultivaveis no interior do canal radicular antes e após o preparo quimico mecanico com solução de 2,5% de hipoclorito de sodio e investigar a possível correlação disso com a presença de sintomas clinicos nos pacientes. Vinte e quatro pacientes que necessitavam de tratamento endodontico foram selecionados para este estudo, com idades entre 16 a 57 anos. Os dentes selecionados eram unirradiculares, com diagnostico de polpa necrosada e evidencia radiografica de periodontite apical. Nenhum dos pacientes relataram dor espontanea; sendo 11 casos assintomaticos e 13 com alguma sensibilidade a percussão e/ou palpação. Anamnese detalhada foi preenchida e os pacientes que estiveram sob tratamento com antibioticos 3 meses antes do experimento ou que tiveram alguma doença sistematica foram excluidos. Os dentes foram isolados e a desinfecção da superficie externa e de estruturas adjacentes foi feita com peroxido de hidrogenio a 30% seguido de hipoclorito de sodio a 2,5%. As soluções foram inativadas com tiosulfato de sodio a 5%, para se evitar interferencia com as amostras a serem coletadas. A cavidade de acesso foi feita utilizando irrigação manual com solução salina

esteril e brocas diamantadas esterilizadas em alta rotação. Primeiramente foi feita uma remoção principal dos contaminantes (micro-organismos e endotoxina) antes de adentrar em camara pulpar. Esta foi previamente desinfetada como descrito anteriormente. Uma nova broca esteril é utilizada para acesso propriamente dito da camara pulpar e canais radiculares sob irrigação manual de solução salina esteril. Pontas de papel absorvente esterilizadas de diametro 35 são introduzidas no interior do canal radicular, em todo seu comprimento (determinado radiograficamente) e mantidas por 60 segundos. Algumas pontas de papel absorvente são analisadas cromogenicamente através do sistema LAL para se detectar endotoxina e algumas pontas de papel são submetidas a cultura microbiana para detecção de especies bacterianas. Apos essa primeira coleta de amostras iniciais, o canal radicular é limpo atraves do uso de solução de hipoclorito de sodio a 2,5% e de instrumentos tipo K de diamentro 10 e 15, em toda a extensão. É feito acesso radicular com instrumentos Great Taper e Gates Glidden. O comprimento de trabalho considerado adequado – 1mm aquem do apice radiografico – foi registrado radiograficamente após a confirmação com o localizador foraminal eletrónico. Foi realizado o preparo apical com 3 instrumentos além do instrumento apical inicial e escalonamento reverso com até 3 instrumentos maiores que o instrumento apical final. Entre cada troca de instrumento foi feita a irrigação com 5 ml de solução de hipoclorito de sodio a 2,5%. O tempo do preparo quimico mecanico foi de 20 minutos para todos os casos em media. A solução de irrigação de hipoclorito de sodio foi inativada com 5 ml de tiosulfato de sodio a 0,5% por 1 minuto. Foi realizada a segunda coleta de amostras, da forma anteriormente descrita. As culturas foram incubadas a 37°C em atmosfera anaeróbia por 14 dias. O teste de analise quantitativa cromogenico LAL foi utilizado para se medir a concentração de endotoxina no interior dos canais radiculares antes e depois do preparo biomecanico. A endotoxina estava presente em 100% das amostras recolhidas do interior do canal radicular após o preparo. Valores maiores da concentração de endotoxina foram encontrados em dentes com sintomatologia dolorosa. Houveram diferenças estatísticas significativas na quantidade de LPS encontrado em dentes sintomaticos e assintomaticos. Nenhuma correlação foi encontrada entre LPS e dor a palpação. Em contraste, correlação positiva entre presença de LPS e sensibilidade a percussão. Apos o preparo quimico mecanico, a quantidade de LPS decaiu. A quantidade de LPS das amostras iniciais foi significativamente maior que nas amostras finais. A alta sensibilidade do teste LAL (DAHLÉN *et al.*, 1980) permite a detecção e quantificação de LPS em canais radiculares infectados (JACINTO *et al.*, 2005; VIANNA *et al.*, 2007).

Entretanto atenção especial deve ser dada ao seu uso em infecções endodónticas, devido a interferências de outros materiais biológicos como exsudato inflamatório (SULLIVAN *et al.*, 1975) e presença de bactérias gram positivas (WILDFEUER *et al.*, 1974) que podem interferir nos resultados. A fim de se evitar essas interferências, uma série de diluições sequenciais foram executadas. Embora muitos estudos clínicos tenham demonstrado redução bacteriana após preparo químico mecânico com solução de hipoclorito de sódio a 2,5%, nenhuma informação foi fornecida sobre eficácia do preparo químico mecânico com hipoclorito de sódio a 2,5% na redução do LPS bacteriano em dentes com polpa necrosada e periodontite apical. Bactérias e LPS foram encontrados em todas as amostras iniciais, confirmando a forte correlação entre bactérias e seus subprodutos (KAKEHASHI *et al.*, 1965; RIETSCHKE *et al.*, 1992; DAHLEN *et al.*, 1981; PITTS *et al.*, 1982; TANOMARU *et al.*, 2003) e presença de periodontite apical. Nenhuma associação pode ser feita entre a quantidade de bactérias viáveis e presença de sintomas clínicos (dor à palpação ou sensibilidade à percussão). Entretanto, foi demonstrado forte relação entre sintomas clínicos (dor à palpação ou sensibilidade à percussão) e altos índices de endotoxina no interior do canal radicular, particularmente nos casos de sensibilidade à percussão. Tal correlação sugere que um aumento nos níveis de endotoxina em canais radiculares infectados pode estar associado com um avanço da periodontite apical e conseqüentemente desenvolvimento de sintomas clínicos (dor à palpação ou sensibilidade à percussão). Devido ao fato do LPS ser liberado durante morte e autólise de bactérias gram - (NAIR *et al.*, 2004), uma proporção inversa entre quantidade de bactérias e LPS no canal radicular após preparo químico mecânico é esperado, ao menos que a instrumentação seja capaz de remover a endotoxina ou auxiliar o hipoclorito de sódio a neutralizá-la. Não há estudos consistentes para tal afirmativa e para este foi observado redução da carga bacteriana e de LPS após preparo químico mecânico com hipoclorito de sódio a 2,5%. Demonstrou-se que o preparo químico mecânico com hipoclorito de sódio a 2,5% foi capaz de reduzir o LPS. Porém, não foi capaz de eliminá-lo.

De acordo com Lin *et al.* (2009), lesões associadas a periodontite apical tais como granulomas, abscessos e cistos falham na cura após terapia endodóntica não cirúrgica pelo mesmo motivo: a persistência de infecção intraradicular e/ou extraradicular. Está bem estabelecido que a infecção no canal radicular é a causa primária (KAKEHASHI *et al.*, 1965; MOLLER *et al.*, 1991) e recorrente (NAIR *et al.*, 1990; LIN *et al.*, 1991) da

periodontite apical.

Gomes *et al* (2009) compararam a eficacia do preparo quimico mecanico utilizando o hipoclorito de sodio a 2,5% e clorexidina 2% em gel como substancias auxiliares de irrigação na redução do LPS bacteriano em dentes com polpa necrosada e periodontite apical visível radiograficamente. Cinquenta e quatro pacientes que necessitavam de tratamento endodontico foram incluídos nesta pesquisa, de idades entre 18 a 62 anos. Os dentes eram unirradiculares, com canal central único. A camara pulpar não mantinha comunicação com fluidos orais. Os pacientes não tinham doença periodontal. Nenhum dos pacientes relataram dor espontanea e uma anamnese completa foi preenchida antes dos procedimentos. Pacientes que receberam antibioticos três meses antes do experimento ou que tiveram alguma doença sistêmica foram excluídos da pesquisa. Todos os materiais utilizados foram esterilizados em autoclave a 200°C por 4 horas. Os dentes foram isolados com lençol de borracha e a coroa e estruturas vizinhas foram desinfetadas com solução de agua oxigenada por 30 segundos seguido de solução de hipoclorito de sodio a 2,5% por mais 30 segundos. Solução de tiosulfato de sodio a 5% foi usada para inativar o irrigante. A cavidade de acesso foi realizada com irrigação manual de solução salina esteril e broca diamantada esteril em alta rotação. Em um primeiro momento foi feita uma remoção maior de contaminantes para que, antes de acessar a camara pulpar propriamente dita, uma nova desinfecção fosse refeita. Uma broca nova e esteril foi utilizada para acessar a camara pulpa e o canal radicular. Uma amostra inicial de endotoxina foi removida do interior do canal radicular introduzindo e mantendo por 60 segundos uma ponta de papel esteril de diametro nominal 35 em todo o comprimento do canal, determinado por uma radiografia. Os dentes foram divididos randomicamente em dois grupos de acordo com a solução irrigadora que seria utilizada; o primeiro grupo, fez uso de 5ml de solução de hipoclorito de sodio a 2,5% + 5ml de solução de tiosulfato esteril a 0,5% + 5ml de agua esterilizada para rinsagem; o segundo grupo fez uso de 1ml de clorexidina gel 2% + 4ml de solução salina para rinsagem + 5ml solução Tween 80 durante 1 minuto + 5 ml agua esterilizada. As substancias irrigadoras foram preparadas 24 horas antes do inicio do experimento. Uma segunda amostra de endotoxina foi obtida. O preparo do canal radicular se deu as custas de instrumentação manual com diametros cirurgicos entre 35-45, seguidos de escalonamento reverso em tempo medio de 20 minutos para cada caso; acesso radicular com brocas de Gates Glidden e uso de localizador foraminal eletronico Novapex. Para se determinar a quantidade de endotoxina

presente nas amostras iniciais e finais, um marcador para se detectar cromogenicamente a endotoxina foi utilizado. A absorbancia foi lida utilizando-se um leitor enzimatico de imunoabsorbancia. Como resultado, a endotoxina estava presente em todas as amostras investigadas. A maior porcentagem de redução do conteudo de endotoxina foi no grupo que utilizou o hipoclorito de sodio a 2,5% como substancia irrigadora. Assim, nenhuma das duas substancias testadas foram efetivas na eliminacão de endotoxina dos canais radiculares primariamente infectados. A implicacão clinica deste trabalho é que as atuais e mais usadas substancias auxiliares de irrigacão (hipoclorito de sodio e clorexidina) não são efetivas em eliminar a endotoxina dos canais radiculares infectados. O uso de um sistema mais efetivo como o ultrassom e o uso de medicacão intracanal pode ser um meio eficaz contra o LPS principalmente nos casos onde há sintomatologia espontanea, dor a palpacão, dor a percussão e presenca exsudatos.

Botero *et al* (2010) testaram a hipotese de que o LPS da *Porphyromonas endodontalis* e *Escherichia coli* induz o fator de crescimento vascular endotelial nas celulas tronco da polpa dentaria e nos fibroblastos da polpa dental humana. Pulpite induzida pela carie é geralmente acompanhada de um aumento na densidade microvascular da polpa dental. Entretanto, o mecaniso pelo qual as celulas da polpa dental reconhecem o lipopolissacarideo permanece obscuro. Testes Elisa, Western Blot, PCR, Imunofluorescencia foram utilizados. Observou-se que o LPS induziu o fator de crescimento vascular endotelial nas celulas tronco e fibroblastos da polpa dentaria humana, sendo que esses dois tipos celulares expressaram o TLR4. Notavelmente, a induçao do fator de crescimento vascular endotelial pelo LPS é dependente de da expressao de outras proteínas sinalizadoras. Assim, existe uma via responsavel pela sintese do fator de crescimento vascular endotelial pelas celulas da polpa dentaria e portanto, considera-se essa via como um alvo terapeutico responsavel pelas alteraçoes vasculares em dentes com pulpite.

Ricucci *et al* (2010) avaliaram a prevalencia de biofilmes bacterianos em canais radiculares tratados e não tratados, com periodontite apical. A presenca de biofilme e sintomas clinicos, tamanho da lesao periapical acorde radiografias e exame histopatologico de material coletado das periodontites periapicais tambem foram analisados. As amostras foram obtidas apos cirurgia paraendodontica ou exodontia e entao processadas e analisadas para tecnicas histobacteriologicas e histopatologicas. Ao

total, 106 amostras de lesão periapical foram biopsadas, 64 de dentes sem tratamento endodôntico e 42 de dentes com tratamento endodôntico. Bactérias foram encontradas em todas as amostras, mas de uma só espécie. Arranjos de biofilme intrarradicular foram observados no segmento apical em 77% das amostras (80% dos dentes sem tratamento endodôntico e 74% dos dentes endodônticamente tratados). Biofilme também foi encontrado cobrindo as paredes de ramificações e istmos. Biofilmes bacterianos foram visualizados em 62% e 82% dos canais radiculares de dentes com lesão periapical pequena e grande respectivamente. Todos os canais radiculares com lesão periapical extensa estavam colonizados intraradicularmente com biofilmes. Nenhuma correlação foi encontrada em presença de biofilme e sintomas clínicos. Biofilmes extraradiculares foram observados em apenas 6% dos casos. Esses resultados são consistentes com o critério aceitável de incluir periodontite apical no grupo de doenças induzidas por biofilme bacteriano. A morfologia da estrutura do biofilme varia de caso para caso e não há um padrão único. Biofilmes parecem estar mais fortemente associados a patologias crônicas, de longa duração como lesões periapicais extensas e cistos.

Valera *et al* (2010) avaliaram a ação do propolis e outros medicamentos intracanalares sobre o patógeno *Escherichia coli* e seu LPS. Quarenta e oito dentes humanos foram utilizados neste estudo. Os dentes tiveram suas coroas removidas para padronização do comprimento radicular. Os dentes foram instrumentados inicialmente até instrumento 30 tipo K com irrigação de solução salina após cada recapitulação. A região apical foi selada com resina composta e a superfície radicular dos dentes receberam uma camada de adesivo epoxico, exceto abertura cervical. As amostras foram dispostas aleatoriamente em meios de cultura. As amostras foram contaminadas com a bactéria *E coli*. Uma bolinha de algodão esteril foi posicionada na entrada dos canais radiculares. As amostras foram incubadas por 14 dias em ambiente umidificado a temperatura de 37°C. Após a confirmação da contaminação, feita por uma coleta e análise iniciais, todas as raízes foram novamente instrumentadas até instrumento diâmetro 50 tipo K, com escalonamento reverso até instrumento 80 tipo K. A irrigação foi feita utilizando-se solução de propolis a cada troca de instrumento. Após o preparo, 3ml de solução salina foi inoculado no interior dos canais e uma segunda amostra é coletada para análise. Os canais são preenchidos com solução salina esteril e são incubados por 7 dias. Uma terceira amostra é coletada para análise. As raízes são divididas em 3 grupos de acordo com a mecânica intracanal utilizada: pasta hidróxido de cálcio; polimicina B; associação de hidróxido de cálcio +

clorexidina gel 2% e grupo controle com solução salina esteril. Os dentes são novamente estocados por mais 14 dias para coleta da última amostra para análise. Todas as amostras coletadas do interior do canal radicular foram feitas com auxílio de seringa plástica esteril, para análise microbiológica de cultura em placas de agar e de quantificação de endotoxina através da análise cinética cromogênica ou LAL ou Limulus Amebocyte Lysate. Como resultado, a irrigação do canal radicular com propolis foi efetiva em eliminar completamente a *E coli* e reduzir a quantidade de endotoxina. Todas as medicações intracanaís aqui utilizadas contribuíram significativamente em reduzir a quantidade de endotoxina. Somente a medicação intracanal/curativo de demora é capaz de reduzir a quantidade de endotoxina do interior do canal radicular, sendo que o medicamento mais eficaz foi o de Hidróxido de Cálcio. O propolis se mostrou efetivo contra bactérias, mas com valores menores que quando comparados com outros tipos de medicação intracanal utilizados (hidróxido de cálcio pasta, hidróxido de cálcio associado com clorexidina gel 2 %). O propolis não é capaz de eliminar a endotoxina presente no canal radicular.

Signoretti *et al* (2011) relataram um caso de infecção extraradicular persistente em dente com tratamento endodôntico concluído e posterior análise de amostra coletada através de microscopia eletrônica de varredura e investigação microbiológica após microcirurgia periapical. O caso foi diagnosticado como sendo periodontite apical persistente em primeiro molar inferior esquerdo e lesão periapical, que necessitava de retratamento endodôntico não cirúrgico e cirurgia apical para sua resolução. O dente foi tratado endodônticamente 3 meses antes do estudo e foi retratado por especialista a partir da técnica coroa apical utilizando como substância química auxiliar de irrigação clorexidina gel 2%. Procedimentos de paciência apical, preparo e obturação foram realizados em sessão única. A cavidade de acesso foi imediatamente restaurada com resina composta. Após 1 mês, a lesão periapical permaneceu praticamente inalterada. Cirurgia paraendodôntica foi realizada com auxílio de um microscópio clínico, com apicectomia do terço apical com auxílio de pontas de ultrassom e selamento com agregado trióxido mineral. Uma amostra microbiológica foi coletada da lesão periapical e foi imediatamente posta em cultura para aeróbios e anaeróbios em ambiente com temperatura e umidade controlados. A porção final da raiz distal excisada foi examinada através de microscopia eletrônica de varredura. O resultado da análise microbiológica encontrou as seguintes espécies: *Actinomyces naeslundii* and *Actinomyces meyeri*, *Propionibacterium*

propionicum, *Clostridium botulinum*, *Parvimonas micra*, and *Bacteroides ureolyticus*, ou seja, bactérias anaeróbicas gram +. O resultado da microscopia eletrônica revelou formação de biofilme extraradicular ao redor do forame apical e superfície externa da raiz. Sobreobturação com guta percha devido a um zip durante o preparo do primeiro tratamento endodôntico realizado pode ser também observado. O acompanhamento após 6 meses mostrou cura da lesão periapical vista radiograficamente. E após 24 meses, o sucesso foi concluído. Bactérias gram + anaeróbicas e biofilme extraradicular parecem participar ativamente da manutenção da patologia periapical persistente e o retratamento endodôntico seguido de microcirurgia periapical são alternativas de sucesso para estes casos.

Xing *et al* (2011) investigaram o papel do eixo SDF-1/CXCR4 em estimular o LPS a reabsorção óssea inflamatória. Para este estudo foram utilizados como reagentes e anticorpos, o LPS da *Porphyromonas gingivalis*, RANKL, SDF1, INIBIDOR E ANTICORPO contra CXCR4, anticorpo contra TLR 4 e TLR2 de ratos. Monócitos e células pre-osteoblásticas de ratos foram cultivados e tratados com LPS por 24 horas. A manipulação desta cultura através do uso dos reagentes e anticorpos, possibilitou análise quantitativa de RNA através do PCR para genes específicos que expressam SDF1, CXCR4 TLR2 E TLR4, análise Western Blot para identificação de reagente+anticorpo, análise de diferenciação em osteoclastos e migração de osteoclastos. Os resultados mostraram que o LPS não influencia a expressão do SDF-1/CXCR4 nos osteoblastos, mas regula a expressão nos pre-osteoclastos via TLR 4, o que aprimora a migração de pre-osteoclastos. Além disso, o LPS promove a diferenciação dos osteoclastos pela indução RANKL. Ou seja, a regulação da expressão SDF-1/CXCR4 nos pre-osteoclastos pela estimulação do LPS é envolvida juntamente com a perda óssea. O LPS não altera a expressão do SDF-1 e CXCR4 nos pre-osteoblastos. Entretanto, o LPS promove a expressão do CXCR4 em pre-osteoclastos reforçando então sua resposta ao SDF-1 sob exposição ao LPS. O LPS estimula diferenciação dos pre-osteoclastos e inibe a CXCR4. Essa inibição do CXCR4 não inibe completamente a diferenciação dos pre-osteoclastos. Ou seja, existem outros mecanismos de regulação da diferenciação de pre-osteoclastos. A expressão do CXCR4 promove migração e diferenciação de pre-osteoclastos sob exposição ao LPS. O LPS aumenta a expressão do CXCR4. Essa migração de pre-osteoclastos é reduzida significativamente pela inibição da expressão do CXCR4. Esses resultados podem fornecer novas maneiras de intervenção terapêutica para se tratar

doenças osseas inflamatórias induzidas pelo LPS. Baseado nas evidências acima, acredita-se que SDF-1 e CXCR4 desempenham um papel importante na regulação específica de osteoclastos em reabsorções osseas inflamatórias. O papel do SDF-1/CXCR4 (fator 1 estroma derivado e seu único receptor) versus LPS em induzir a perda ossea não foi estudado.

Baik *et al* (2011) avaliaram se o hidróxido de cálcio inativa a molécula de ácido lipoteico da bactéria *Enterococcus faecalis* através da deacetilação da molécula de lipídeo. O Hidróxido de Cálcio atenua a atividade inflamatória do *E. Faecalis* através da deacetilação do ácido lipoteico. O Hidróxido de Cálcio manteve-se em contato com moléculas de LTA da bactéria *E. faecalis* por 24 horas, *in vitro*, e a cultura foi analisada para produção de óxido nítrico, interferon 10 e proteína inflamatória do macrófago de camundongos. Na presença de Hidróxido de Cálcio, a produção desses mediadores inflamatórios pelos macrófagos de camundongos foi suspensa, mostrando que o Hidróxido de Cálcio pode reduzir a habilidade do LTA de *E. Faecalis* em induzir citocinas pró inflamatórias em macrófagos. O dano na molécula de lipídeo dos fatores de virulência bacterianos compostos de glicolipídeos parecem ser o único mecanismo de detoxificação do Hidróxido de Cálcio.

Martinho *et al* (2011) compararam os níveis de endotoxina em infecções endodônticas primárias em estudos mais antigos. O estudo foi conduzido a fim de se determinar qual método quantitativo (parâmetro cromogênico, cinética cromogênica, cinética turbidimétrica) melhor se encaixa para análise da infecção endodôntica primária. Vinte e um pacientes foram selecionados para o tratamento endodôntico de dentes com polpa necrosada e evidência radiográfica de periodontite apical. Os dentes foram isolados, coroa e estruturas vizinhas foram desinfetados. Cavidade de acesso foi realizada em duas etapas com irrigação manual com solução salina estéril e desinfecção prévia antes do acesso propriamente dito à câmara pulpar. Uma amostra inicial foi coletada com pontas de papel absorvente estéreis de diâmetro 15 inseridas em todo o comprimento do canal radicular estabelecido através de radiografia. As pontas de papel foram imediatamente colocadas em um frasco de vidro e congeladas para futura análise LAL. As amostras foram analisadas em 3 diferentes testes: parâmetro cromogênico, análise cinética cromogênica e análise cinética turbidimétrica). Como resultado, todos os três testes foram efetivos na retomada da endotoxina nos casos de canais radiculares

infectados. Não houve diferenças significativas nos valores encontrados para cada estudo individualmente, porém, os estudos revelaram que a análise cinética turbidimétrica e análise cinética cromogênica são os mais precisos.

Trombetta-e-Silva *et al* (2011) investigaram a perda óssea e a perda de elementos do ligamento periodontal (PDL) induzidas pelo LPS em ratos mutantes livres da expressão de osteonectina/SPARC. Neste estudo a doença periodontal foi induzida através de injeções de 2µL de solução aquosa de lipopolissacarídeo da bactéria *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* na região entre primeiros e segundos molares inferiores do lado direito de ratos, na gengiva palatina, 3 vezes por semana durante 4 semanas. Uma solução controle livre de endotoxina foi injetada na mesma região entre primeiro e segundo molares inferiores do lado esquerdo, também na gengiva palatina. A injeção de LPS resultou em significativa perda óssea nas duas espécies de ratos, a mutante e a selvagem. Porém, a perda óssea foi maior ainda nos casos onde a osteonectina estava nula (ratos mutantes), exibindo degradação de tecido conectivo e gengiva. Portanto, a presença de osteonectina protege o conteúdo de colágeno do ligamento periodontal e do osso alveolar nos casos de doença periodontal. O estudo *in vivo* sugere que diferenças na composição e estrutura da matriz extracelular, variável de indivíduo para indivíduo, é um fator crítico e determinante na severidade da doença periodontal.

Ferraz *et al* (2011) testaram a hipótese de que neurônios nociceptivos do gânglio trigeminal são diretamente sensibilizados pelo LPS isolado do patógeno *Porphyromonas gingivalis*. *Porphyromonas gingivalis*, uma bactéria gram negativa detém um grande número de fatores de virulência incluindo fibras, hemaglutinina, cápsula e vesículas de membrana, potentes enzimas hidrolíticas e o complexo lipopolissacarídico. Esses fatores de virulência podem iniciar no hospedeiro um mecanismo de defesa levando à destruição tecidual. Além desses fatores, o LPS é um potente estimulante da resposta imune inata do hospedeiro contra infecções de bactérias gram negativas. O LPS media funções biológicas através da ativação do receptor TLR4 e imprime a diferenciação do receptor 14 em CD14. Além disso células que expressam receptor TLR4 ou CD14 tem potencial para detectar LPS derivado de bactérias. Infecções de origem odontogênicas são frequentemente acompanhadas de dor e pouco se sabe sobre os mecanismos que mediam esse efeito. No geral é possível que subprodutos bacterianos atuem indiretamente nociceptores via liberação de fatores do próprio hospedeiro

(prostaglandinas, leucotrienos, citocinas) estimulados pela ativação de caminhos como os do receptores do sistema imune inato expressado pelas células próximas (macrófagos, neutrófilos). Como alternativa é possível que subprodutos bacterianos ou até mesmo a própria bactéria ative diretamente os nociceptores. Isso foi observado pela ativação do TRL4 e CD4 que são expressados nos nociceptores do gânglio trigeminal que expressam por seguinte o receptor de capsaicina (TRPV1). Os experimentos conduzidos *in vitro* com culturas de neurônios trigeminais de ratos demonstraram que o pré tratamento com LPS produziu uma sensibilização de receptores TRPV1, liberando calcitonina. Assim, foi demonstrado uma sensibilização direta de nociceptores neuronais pelo LPS em concentrações encontradas no canal radicular infectado como um mecanismo responsável pela dor associado a infecção bacteriana. Demonstrou-se então, pela primeira vez, que o LPS da *Porphyromonas gingivalis* nas mesmas concentrações encontradas em canais radiculares infectados sensibilizou significativamente uma resposta a partir do TRPV1 em neurônios trigeminais. Esta descoberta tem uma implicação clínica e científica clara e pode iluminar o mecanismo pela qual a bactéria sensibiliza diretamente os nociceptores trigeminais e o mecanismo responsável pela dor associada a infecções bacterianas.

Diogenes *et al* (2011) avaliaram se o LPS ativa os neurônios trigeminais e sensibiliza o seu receptor, o TRPV1, via TRL4. Estudos recentes demonstraram que o receptor de lipopolissacarídeo TRL4 é expressado no receptor TRPV1 de neurônios sensoriais do gânglio trigeminal. A função do receptor TRPV1 é detecção e regulação da temperatura corporal, além de promover a sensação de calor e dor (função nociceptora). A resposta imune nata representa a primeira linha de defesa contra os microrganismos invasores. A ativação se dá através do reconhecimento específico de receptores para moléculas específicas. Esses receptores transmembrana são ligados a componentes distintos de vários patógenos. Por exemplo, uma bactéria gram negativa é reconhecida pelo TRL4 quando há a ligação deste receptor com um componente bacteriano ligante que é o lipopolissacarídeo expressado na parede celular. Essa hipótese tradicional de dor associada a infecção bacteriana inclui a sensibilização e ativação de nociceptores de inflamação liberados das células imunes em resposta a presença bacteriana e de suas toxinas. Neurônios trigeminais existem receptores para o LPS. Esses achados sugerem a hipótese de que os nociceptores inflamatórios estão diretamente ligados a bactérias gram negativas via reconhecimento do LPS pelo TRL4. Para se demonstrar esta hipótese

provou-se primeiro que o LPS se liga a receptores de neuronios trigeminiais através de uma ligação competitiva. Foi demonstrado também que o LPS provoca um aumento do acumulo intracelular de ions cálcio. Por ultimo contactou-se que o LPS sensibiliza significativamente o receptor TRPV1 liberando calcitonina. Um antagonista do receptor TLR4 bloqueou estes efeitos. Analisando estes dados é possível demonstrar que o LPS é capaz de ativar diretamente neurônios trigeminiais e sensibilizar o receptor TRPV1 via TLR4. Isso é consistente com a hipótese que neurônios trigeminiais são capazes de detectar componentes bacterianos patogênicos levando a sensibilização de TRPV1 contribuindo possivelmente com a dor de origem inflamatória frequentemente observada em infecções bacterianas.

Yamagishi *et al* (2011) investigaram o efeito do lipopolissacarideo da *Porphyromonas gingivalis* na expressão da sialofosfoproteína e osteocalcina de células progenitoras das polpa. As células tronco/progenitoras da polpa dental humana podem se diferenciar em células do tipo odontoblastos podendo expressar sialofosfoproteína da dentina e osteocalcina, assim elas podem ser usadas para regenerar a dentina. Entretanto componentes bacterianos residuais no canal radicular podem suprimir essa atividade. Células tronco da polpa dental humana foram expostas a concentrações diferentes da *P.gingivalis* e a expressão da sialofosfoproteína e osteocalcina foram analisados. Como resultados as células progenitoras da polpa expostas a diferentes concentrações de LPS exibiram uma redução na expressão na sialofosfoproteína e osteocalcina. A expressão sialofosfoproteína e osteocalcina, após exposição de 20ug/ml de LPS foi significativamente mais baixa quando comparado as células não expostas. O efeito supressor da *P.gingivalis* sobre a matriz mineralizada formada pelas células progenitoras da polpa é confirmado. O bloqueio de receptores TLR2 de reconhecimento do hospedeiro para a presença do patógeno pode moderar essa supressão. Confirma-se então a supressão dos genes envolvidos na formação de matriz mineralizada pelas células progenitoras da polpa uma vez expostas ao LPS bem como a supressão da sialofosfoproteína dentinaria e osteocalcina. O bloqueio do receptor TLR 2 foi capaz de inibir a supressão do gene pela bactéria. Assim destaca-se a necessidade de se eliminar a infecção do espaço do canal radicular como uma parte integrante dos processos regenerativos.

Chokechanachaisakul *et al* (2011) analisaram os níveis de expressão dos genes

associados na diferenciação e função dos macrófagos residentes na polpa estimulados pelo lipopolissacarídeo em ratos. Macrófagos são conhecidos por mostrar considerável heterogeneidade em termos de morfologia, fenótipos e função. A heterogeneidade é um resultado de uma especialização dos monócitos circulantes dependendo do ambiente onde eles são expostos durante a diferenciação. Existem dois principais caminhos de diferenciação dos macrófagos em que se subdividem em macrófagos inflamatórios e macrófagos residentes. Os macrófagos inflamatórios expressam uma quimioquina e é recrutado para os locais onde há inflamação aguda onde lá eles se diferenciam em macrófagos ativos participantes do processo inflamatório. Nesse meio há um aumento do recrutamento de macrófagos. Os macrófagos residentes expressam uma outra quimioquina e estão normalmente distribuídos na maioria dos órgãos e tecidos incluindo a polpa dental. A função desse tipo de macrófago ainda não é bem esclarecida, porém presume-se que eles desempenham um papel na remodelação tecidual, apoptose celular, como sentinelas do sistema imune nato. Na inflamação os macrófagos residentes podem se diferenciar em resposta a inflamação local e participar do processo inflamatório junto com os novos macrófagos inflamatórios recrutados. O fator de estimulação colonial é um dos fatores de crescimento que regulam a proliferação e sobrevivência dos macrófagos e a diferenciação dos macrófagos residentes. Foram utilizados os primeiros molares inferiores de ratos machos Wistar. Pulpotomia e inoculação de LPS foram aplicados aos dentes experimentais. As mandíbulas foram dissecadas para cultura por 3 dias. Dentes com polpa normal foram submetidos a pulpotomia mas sem inoculação de LPS serviram como controles. As amostras então foram marcadas com um marcador de macrófago residente em com marcador de macrófago inflamatório. A análise de PCR (reação em cadeia da polimerase) para o receptor TLR4, CD14 e RNA mensageiro foi conduzida. Como resultado as amostras pulpares tratadas com LPS mostraram um significativo aumento na densidade de marcadores para macrófagos residentes e inflamatórios, além da expressão para receptores TLR4, CD14 além de outras quimioquinas. Como conclusão o tratamento com LPS resultou em acúmulo de macrófagos residentes e aumentou a expressão de TLR4, CD14 e quimioquinas nas células da polpa. O aumento da expressão dessas moléculas químicas pode estar envolvido da diferenciação e migração de macrófagos residentes da polpa.

Ferraz *et al* (2011) testaram se a hipótese de que neurônios nociceptivos trigeminais são diretamente sensibilizados pelo lipopolissacarídeo bacteriano isolado do

patogeno endodontico *Porphyromonas gingivalis*. Os estudos in vitro deste trabalho conduziram experimentos com neuronios trigeminais de ratos, que demonstraram que a exposiçao desses neuronios ao LPS produziu um aumento significativo do peptideo CGRP, sensibilizando o receptor TRPV1, resultando em uma sensibilizaçao direta de neuronios trigeminal pelo LPS. Concluiu-se que o TLR4 é colocalizado com o CGRP, nas fibras nervosas da polpa dental humana. Este ultimo é um neuropoeptideo sintetizado e liberado pelos nociceptores de capsaicina quando ativados, sendo envolvidos no desenvolvimento da inflamaçao neurogenica, levando a vasodilataçao e edema. A capsaicina (componente de pimentas, utilizado em estudos in vitro) ativa seletivamente o canal TRPV1, exclusivo de neuronios sensoriais de nociceptores, ativado pelo calor e baixo ph, características da inflamaçao estabelecida. Este TRPV1 é ativado naturalmente por mediadores inflamatorios, inclusive pela interaçao LPS-TLR4 (que promove cascata inflamatoria, liberando esses mediadores) sendo responsavel pela sensibilizaçao de neuronios trigeminais. Os mecanismos de dor causados por infecçoes ododntogenicas permanecem obscuros. No geral, é possível que subprodutos bacterianos ativem indiretamente nociceptores atraves da liberaçao de fatores do hospedeio (prostaglandinas, leucotrienos, citocinas), funcionando como um gatilho para açao de macrofagos, neutrofilos. É possível tambem que subprodutos bacterianos ou ate mesmo bacteias ativem diretamente nociceptores pelo TRL4 e CD14 que são expressados pelo ganglio trigeminal pelo receptor capsaicina, o que foi comprovado por este estudo. Nociceptores no ganglio trigeminal expressam TRL4 e CD14 e não é sabido ainda se os terminais nervosos da polpa, sensitivos a capsaicina expressam o TLR4 e ainda não foi demonstrado se o LPS ativa esses nociceptores ou os sensibiliza. Neste estudo, avaliou-se se os neuronios da polpa dental humana co-expressam TLR4 e o TRPV1. Em um estudo anterior recente (JACINTO *et al.*, 2005), verificou-se que o LPS era detectavel em 3,7ug/ml nos casos de pacientes com dor espontanea, enquanto que nos casos assintomaticos, o valor era de 2,4ug/ml, mostrando uma correlaçao positiva entre concentraçao de endotoxina presente no sistema de canais radiculares e a presençao de sinais e sintomas endodonticos. Em outro estudo (HORIBA *et al.*, 1991), foi avaliada a quantidade de endotoxina de 30 dentes unirradiculares com polpa necrosada e periodontite apical. Os resultados mostraram o alto indice de LPS nos casos sintomaticos e com exsudatos. Esses estudos correlativos são consistentes na hipotese de que o LPS nas infecçoes clinicas está relacionado a dor espontanea e alodinia. Essas hipoteses são fortalecidas pelos estudos preclnicos em que injeçao de LPS em camundongos produziu

comportamento ofensivo e alodinia (CAHILL *et al.*, 1998).

Wang *et al* (2012) investigaram a flora bacteriana primaria e a localização do biofilme extraradicular em periodontites apicais persistentes. As mostras do terço apical excisado cirurgicamente de 23 canais radiculares obturados foram coletados. 5 amostras foram examinadas para presença de biofilme através de microscopia eletrônica de varredura. Outras 5 amostras foram examinadas para presença de biofilme através da coloração de Brown e Breen modificada por Gram. O DNA de 13 amostras foi processado para amplificação via reação de cadeia de polimerase (PCR) e separado através de eletroforese para identificação das sequências. O biofilme extraradicular presente na superfície externa radicular de dentes tratados endodonticamente consiste de abundante e amorfa matéria extracelular e diversas espécies bacterianas agregadas. Foram detectadas as seguintes espécies: *Actinomyces sp. oral*, *Propionibacterium*, *Prevotella sp. oral*, *Streptococcus*, *Porphyromonas endodontalis*, and *Burkholderia*. As espécies predominantes foram *Actinomyces* e *Propionibacterium* com estrutura de fibras que têm por objetivo: aderir fortemente aos debris dentinários forçados além do ápice, facilitar união a outras bactérias ou células de defesa, aderência a superfície radicular. A virulência dessas bactérias e a resistência ao organismo do hospedeiro à infecção parecem ser fatores importantes para o desenvolvimento ou não da lesão periapical. Concluiu-se que as espécies predominantes *Actinomyces* e *Propionibacterium* são as principais e mais importantes contribuintes para formação do biofilme extraradicular e infecção periapical persistente.

Ohkura *et al* (2012) analisaram a expressão do RNAm de transportadores selecionados relacionados à disposição de drogas dentro de células e transporte de prostaglandinas em polpas de dentes de ratos normais e inflamadas com lipopolissacarídeo bacteriano. As proteínas de transporte de membrana (transportadores) desempenham um importante papel na aceitação e/ou fluxo de vários componentes como íons inorgânicos, substâncias bioativas endógenas como prostaglandinas, drogas como anti-inflamatórios não esteroidais. As proteínas de transporte de membrana (transportadores) são proteínas integrais de membrana que agem como porteiros para todas as células e organelas mediando a movimentação de várias substâncias. Os transportadores transferem substratos endógenos e exógenos, em contraste com o canal iônico, que movimenta somente substratos endógenos. Isso é importante para

manutenção da homeostasia das células e tecidos através da ação de absorção de nutrientes e excreção de tóxicos. Essas moléculas também mediam o transporte transmembrana de moléculas bioativas endógenas tais como prostaglandinas essenciais para a atividade dessas moléculas. Esses transportadores são necessários para a absorção de drogas e sua subsequente eliminação. Embora o transporte por membranas de drogas sintéticas por muito tempo têm sido entendido como uma difusão passiva dependente da lipofilicidade das moléculas da droga o papel e importância dos sistemas ativos de carreamento no transporte de drogas através das membranas biológicas ainda não é bem reconhecido. Prostaglandinas são moléculas bioativas sintetizadas pelo ácido aracônico por enzimas intracelulares (ciclooxigenases) e liberada extracelularmente pela ação dos transportadores de prostaglandina. Prostaglandinas mostram um alcance grande com efeitos fisiológicos e patofisiológicos e particularmente, é implicada fortemente na inflamação dor e febre. A redução da síntese de prostaglandina pela inibição do ciclo das ciclooxigenases é um mecanismo principal de ação das drogas anti-inflamatórias não esteroidais. Com relação a polpa dental a prostaglandina é considerada um importante fator de modulação da inflamação já que a sua síntese aumentou em experimentos a inflamação das polpas dentárias em modelos animais. Os níveis de prostaglandina na circulação sanguínea da polpa são muito mais altos durante uma inflamação do que em polpa normal. Os anti-inflamatórios não esteroidais reduzem o aumento da síntese de prostaglandina e reduzem a permeabilidade vascular em polpas estimuladas por lipopolissacarídeo, o que pode implicar a prostaglandina no aumento da permeabilidade vascular. Além disso a prostaglandina também tem sido relacionada a dor pulpar já que os anti-inflamatórios não esteroidais inibem a estimulação nervosa intra dental em gatos. Os níveis de prostaglandina são maiores em pulpites que em polpas assintomáticas. O tecido pulpar de dentes incisivos de ratos foram analisados para reverter a reação em cadeia da polimerase a fim de se detectar isoformas transportadoras de polipeptídeos, ânions, cátions, e famílias de proteínas associadas a droga. Os níveis de expressão de RNA mensageiro para transportadores de prostaglandinas foram comparados com os encontrados em polpa normal e polpa inflamada pelo LPS utilizando-se a reação em cadeia da polimerase (PCR). O tecido pulpar expressou RNA mensageiros para vários transportadores, enquanto que o tecido pulpar inflamado com LPS teve uma diminuição da expressão de RNA mensageiro para transportadores. A polpa dental de incisivos de ratos expressou RNA mensageiro para várias isoformas de transportadores; e os níveis de rna mensageiro para transportadores de prostaglandinas foram significativamente

aumentados ou diminuídos nas amostras de polpa inflamadas com LPS. Estudos estão falhos no que se refere a expressão de vários transportadores do tecido pulpar, embora este conhecimento daria uma base para o entendimento de características patofisiológicas deste tecido tais como controle farmacológico da dor dental e inflamação pulpar.

Marinho *et al* (2012) avaliaram a influencia do alargamento apical através de instrumentos rotatorios na redução do nível de endotoxina de canais radiculares. 40 canais radiculares de pre molares inferiores recentemente extraídos foram utilizados. Os dentes foram mantidos em solução salina até serem utilizados. As coroas foram seccionadas até junção cimento esmalte para padronização de comprimento radicular em 15 mm. Patencia apical foi determinada com instrumento 08 tipo K até forame. Os canais foram instrumentados até instrumento 20 tipo K a nível foraminal em rotação alternada com irrigação de 5 ml de agua destilada. Smear layer foi removida com hipoclorito de sodio a 5,25% por 10 minutos sob agitação + EDTA a 17%. Os dentes foram lavados com agua destilada e secados com pontas de papel absorvente. A regioo apical foi selada com resina para evitar qualquer permeabilidade e a superficie externa dos dentes foi recoberta com resina epoxica. As amostras foram esterilizadas em autoclave e divididas em grupos de cultura. Solução de endotoxina de *E coli* foi inoculada em 30 dentes e foram incubados por 24 horas a 37°C. Dez dentes serviram de grupo controle. Após o período de incubação, foram removidas amostras iniciais de todos os dentes a fim de medir a quantidade de endotoxina inicial presente nos canais radiculares. Para tal, pontas de papel absorvente estereis foram utilizadas para coleta e posterior cultura. A instrumentação com sistema MTWO foi realizada e irrigação manual com agua esteril pelo mesmo operador em todos os dentes. A segunda coleta de amostra foi realizada e a analise LAL foi utilizada para determinação da quantidade de endotoxina nas amostrais iniciais e finais após preparo com MTWO. Redução substancial do conteudo de endotoxina foi obtido quando o ultimo instrumento MTWO utilizado foi 35/0,04 e 40/0,04. Entretanto, o preparo do canal radicular não é capaz de eliminar a endotoxina. O canal radicular preparado acima do diametro 30/0,05 mostrou melhor performance que facilita a remoção da endotoxina do canal radicular. O tamanho/grau de alargamento apical implicou significativamente na remoção de endotoxinas do canal radicular. De fato, um alargamento apical maior que o ISO 30 é recomendado para remover não somente endotoxina do canal radicular mas como tambem dentina infectada. Alem disso, isso

permite uma irrigação mais profunda e contribui para limpeza de bifurcações, canais acessórios e deltas apicais. Sob estas condições, fica claro que quanto maior alargamento apical, maior a redução do conteúdo de endotoxina. Apesar de o estudo concluir que o preparo acima de diâmetro 30/0,05 é mais efetivo para remoção da endotoxina no interior do canal radicular, a determinação da lima apical inicial (diâmetro anatômico do canal radicular) é um dos passos mais importantes para se determinar o correto alargamento apical, principalmente quando o preparo é baseado na regra de 3 instrumentos de diâmetro acima do instrumento apical inicial.

Liu *et al* (2012) avaliaram o papel da proteína quinase p38 mitógeno ativada na expressão de VCAM1 induzida pelo lipopolissacarídeo da *Porphyromonas gingivalis* em células endoteliais da artéria aorta em humanos. O lipopolissacarídeo da *Porphyromonas gingivalis* parece estar relacionado com a indução da expressão da molécula de adesão vascular VCAM1 nas células endoteliais do vaso. Esta afirmação sugere o papel em potencial deste LPS na patogênese da arteriosclerose. Análises de PCR e Western Blotting foram utilizadas respectivamente para investigar a expressão de RNA mensageiro e produção da proteína VCAM1 nas células endoteliais da artéria aorta humana induzida pelo LPS da *Porphyromonas gingivalis*. O envolvimento da proteína quinase p38 mitógeno ativada em sinalizar um caminho para expressão da VCAM1 também foi investigado. Como resultados, o LPS do patógeno induziu a expressão de VCAM1 nas células endoteliais da aorta. O inibidor da proteína p38 atenuou significativamente a indução de VCAM1 pelo LPS. Ativação da p38 é parcialmente envolvida na expressão de VCAM1 pelo LPS nas células para aceleração da arteriosclerose. A proteína quinase mitógeno ativada P38 está envolvida na resposta celular frente ao estímulo de componentes bacterianos. Como lipopolissacarídeo.

Gomes *et al* (2012) compararam os níveis de endotoxina bacteriana (lipopolissacarídeos) em infecções endodônticas primárias e secundárias com periodontite apical visível radiograficamente, correlacionando os níveis de LPS encontrados nas amostras com os achados clínicos e radiográficos. A presença de bactérias gram – anaeróbicas tem sido investigada. Amostras com 15 canais radiculares com infecção primária e 15 canais radiculares com infecção secundária foram coletadas através dos usos de pontas de papel absorvente esterilizadas. As pontas de papel imediatamente foram analisadas através do parâmetro Limulus Amebocyte Lysate com o objetivo de se

quantificar endotoxina e através da técnica de reação em cadeia polimerase PCR, com o objetivo de se identificar bactérias presentes. Como resultado, endotoxinas estavam presentes em 100% das amostras coletadas, tanto em infecções primárias quanto secundárias. Nos casos de infecção primária, os dentes com sintomatologia dolorosa tiveram índices maiores de endotoxina. Com relação a reabsorção ossea, este estudo encontrou níveis mais altos de endotoxina em dentes com imagens radiolúcidas maiores, elucidando o papel da endotoxina na perda ossea presente nas periodontites. É sabido que o LPS funciona como um potente estimulador de citocinas preinflamatórias envolvidas na destruição de tecido periapical. Dentes com infecção endodôntica primária apresentam níveis maiores de endotoxina que dentes com infecção secundária, explicado pela severidade da doença periapical assim como características clínicas específicas de dentes com infecção primária. Como resultado do exame bacteriológico, o grupo de bactérias mais comuns em infecções endodônticas primárias são: *P. nigrescens*, *P. Endodontalis*, *F. nucleatum*, *T. denticola*, e *T. Socranskii*, sendo as espécies com o LPS mais tóxico. Nas infecções secundárias, as mesmas espécies foram encontradas, porém, em menor quantidade. Logo, dentes com infecção primária tem os níveis mais altos de endotoxina e uma complexa comunidade de bactérias gram -, quando comparados aos dentes com infecção secundária. Além disso, os níveis de endotoxina são associados a severidade da destruição ossea e desenvolvimento de sinais e sintomas clínicos em dentes com infecção primária.

Oliveira *et al* (2012) investigaram os efeitos do tratamento endodôntico na redução da endotoxina usando diferentes soluções irrigadoras em dentes com polpa necrosada e periodontite apical e seus efeitos citotóxicos. Trinta e seis pacientes foram selecionados, os dentes foram isolados, a superfície da coroa e áreas adjacentes foram previamente desinfetadas e o acesso a cavidade pulpar foi feito com irrigação manual de solução salina esteril. Uma primeira amostra foi coletada com uma seringa, antes do uso de qualquer substância antimicrobiana, com os canais inundado de solução salina esteril. Após a primeira amostra coletada, os canais foram preparados com o sistema Endo Eze na medida 3 mm aquém do comprimento total do dente calculado na radiográfica inicial. Durante o preparo, foi utilizado clorexidina gel 2% seguido de solução salina esteril. O comprimento de trabalho foi calculado a 1 mm aquém do ápice radiográfico através da confirmação radiográfica. Os dentes foram divididos em 3 grupos, de acordo com a solução que receberiam para o término do preparo apical, feito com 4 instrumentos tipo K:

clorexidina e hidróxido de cálcio 0,14%; clorexidina gel 2%; solução salina esteril + hidróxido de cálcio 0,14%; clorexidina + polimicina B; clorexidina gel 2% + solução salina esteril + polimicina B; clorexidina gel 2% + solução salina esteril. Uma segunda amostra de cada canal foi coletada após rinsagem com solução salina e uma terceira amostra após uso de EDTA e solução salina. Os canais foram secados e preenchidos com medicação intracanal a base de hidróxido de cálcio e clorexidina gel 2%. Quarenta dias depois, os canais foram novamente acessados, e uma quarta amostra foi coletada através de uma seringa. Os dentes foram obturados com técnica de condensação lateral, restaurados definitivamente e os casos foram acompanhados por um período de 2 anos. As amostras foram submetidas a quantificação de endotoxina através da análise cinética cromogênica LALe foram também avaliados os efeitos citotóxicos em culturas de macrófagos, através da produção de interleucinas e fator de necrose tumoral destes. Como resultados, a endotoxina foi detectada em todos os canais radiculares antes da instrumentação. O grupo que utilizou clorexidina + hidróxido de cálcio apresentou os melhores resultados no que se refere a redução de endotoxina após a instrumentação. O resultado do grupo que utilizou clorexidina + polimicina B também foi bastante similar. A medicação intracanal promoveu uma neutralização importante no conteúdo da endotoxina. As amostras iniciais antes do preparo obtiveram os maiores índices de produção de fator de necrose tumoral e interleucinas nos macrófagos. A combinação de clorexidina e hidróxido de cálcio como solução irrigadora se mostrou muito eficiente na redução de endotoxinas dos canais radiculares e a medicação intracanal foi importante para neutralizar os efeitos citotóxicos. Este trabalho demonstrou que o hidróxido de cálcio não perdeu sua habilidade em neutralizar o LPS bacteriano na presença de clorexidina gel. A combinação destes dois medicamentos mostrou efeitos positivos na redução do conteúdo de endotoxina do interior do canal radicular.

Martinho *et al* (2012) investigaram a correlação entre diferentes sintomas clínicos e características radiográficas de acordo com os níveis de interleucinas, fator de necrose tumoral e prostaglandinas produzidos pelos macrófagos estimulados pela infecção endodôntica primária com periodontite apical. Vinte e um pacientes necessitando de tratamento endodôntico foram incluídos na pesquisa. Os casos eram de necrose apical e periodontite apical visível radiograficamente. Os dentes foram isolados, o campo operatório foi desinfetado, o acesso coronário foi feito com irrigação manual com solução salina esteril. Uma amostra de endotoxina inicial foi obtida com pontas de papel

absorvente de tamanho 15 inseridas até o comprimento de trabalho determinado radiograficamente. As pontas de papel foram analisadas para se avaliar a quantidade de endotoxina através do protocolo LAL. Para se detectar a presença de bactérias, foi utilizada a análise de reação em cadeia da polimerase PCR. Foi feita a cultura de macrófagos de ratos para se avaliar a capacidade destes em expressar interleucina, fator de necrose tumoral e RNA mensageiro após estimulação com o conteúdo do canal radicular por 24 horas. Bactérias e endotoxinas foram detectados em 100% das amostras. O estudo em macrófagos confirmou a capacidade em expressar as citocinas inflamatórias. Concluiu-se então que cada citocina desempenha um papel diferente no desenvolvimento da lesão periapical, cujos efeitos coincidem com sinais e sintomas clínicos e características radiográficas encontradas em dentes com infecção endodôntica.

Tamai *et al* (2012) investigaram os efeitos da anfotericina B sobre a produção de citocinas pró inflamatórias em resposta ao lipídeo A, o componente bio ativo presente na parede celular de bactérias gram -. Foram usados como reagentes do experimento uma solução aquosa de anfotericina B e lipídeo A sintetizado. Tais reagentes foram inoculados em culturas celulares de fibroblastos humanos. As células foram tratadas com lipídeo A e com e sem anfotericina B e foi examinado através de citometria de fluxo e colorimetria, se houve indução de citocinas e caspase 8, uma protease que desempenha um importante papel na iniciação e execução de apoptose celular. A caspase 8 é ativada por componentes bacterianos como o LPS. A anfotericina obtém sozinha um leve aumento na expressão de interleucinas pelos fibroblastos humanos. Entretanto, quando há presença de LPS no meio, ela coopera regulando a produção de interleucinas. A anfotericina B ativou a caspase 8 e o inibidor de caspase 8 inibiu a produção de interleucinas induzida pela anfotericina e pelo lipídeo A. Logo, a caspase 8 é necessária para a produção de interleucina pela anfotericina e lipídeo A. Concluiu-se que o tratamento periodontal realizado antes do tratamento com anfotericina B pode evitar a produção de citocinas pró inflamatórias induzidas pela presença do lipídeo A. Anfotericina B, um antifúngico usado no tratamento da candidíase, aumenta levemente os níveis de interleucina 6 e 8, importantes no início e perpetuação de processos inflamatórios e destrutivos nos tecidos, porém, na presença de LPS, a anfotericina regulou a produção dessas mesmas citocinas e ativou a caspase 8.

Huck *et al* (2012) avaliaram os efeitos de uma infecção causada pela bactéria *P*

gingivalis e seu LPS na estimulação da produção de catepsina B nas células endoteliais. *P. Gingivalis* foi cultivada sob condições anaeróbicas e o LPS utilizado foi obtido a partir de um preparado ultrapuro comercial. Uma amostra de veias do cordão umbilical humano foram infectadas com a bactéria e outra porção foi infectada com o LPS bacteriano. A reação em cadeia da polimerase foi utilizada como protocolo de análise de RNA m expressados para produção de catepsina B. A atividade enzimática foi determinada utilizando substrato específico. Os efeitos dos Toll Like Receptors 2 e 4 em bloquear a atividade da enzima também foram analisados. Os receptores TRL (Toll Like Receptors) são parte de uma vasta gama de receptores de reconhecimento ao sistema imune inato, que detectam patógenos e desenvolve uma resposta imune. Os resultados mostraram que a bactéria e seu LPS aumentaram a atividade da enzima catepsina B, porém, em diferentes formas. O reconhecimento de fatores de virulência bacterianos pelos TLR's ativa citocinas (fator de necrose tecidual e interleucinas), mediando caminhos da inflamação como ativação de enzimas lisossomais (catepsina B), envolvidas na remodelagem da matriz extracelular e apoptose. O pico enzimático da catepsina B foi observado após 3 horas da contaminação por bactérias, enquanto que para o LPS, o pico foi observado após 48 horas. A inibição dos Toll Like Receptors reduziu a ativação da catepsina pelas bactérias e pelo LPS. Os caminhos nos quais a catepsina B é regulada pela *Porphyromonas gingivalis* sugerem invasão e internalização do processo. A bactéria trafega rapidamente para dentro das células endoteliais do vaso por via autofágica, o que leva cerca de 15 a 120 minutos. O contato com proteases lisossomais funciona como um gatilho para ativação das catepsinas. A consequente ativação da inflamação leva a célula a morte. Já o LPS estimula a síntese de citocinas de células endoteliais a partir da via TRL 4 após 3 horas de estimulação. Assim, o estudo mostrou que as células endoteliais do vaso são a linha de defesa contra as bactérias. A ativação da catepsina e a produção de citocinas são as respostas celulares frente a infecção bacteriana. Isso mostra que a infecção pela *P. gingivalis* afeta rapidamente as células endoteliais e modula a atividade da catepsina B, enquanto que os efeitos do LPS parecem ser mais retardatários.

Tang *et al* (2012) investigaram o papel do LPS na secreção de fatores de virulência da bactéria *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. A secreção de adesina epitelial, receptores de imunoglobulinas e leucotoxina são examinados em uma bactéria mutante. A análise do LPS das bactérias mutantes foi através de cromatografia e espectrometria de massa. Proteínas de membrana e proteínas citoplasmáticas da bactéria são fracionadas e

separadas em proteínas da porção externa da membrana e proteínas da porção interna da membrana. Leucotoxina foi isolada da cultura celular de *A. Actinomycetemcomitans*. As amostras de proteína são diluídas e transferidas para um meio com anticorpos anti adesina epitelial, antiimunoglobulinas e antileucotoxina e analisadas através do protocolo Immunoblot (Western Blotting). O RNA da bactéria é isolado, estabilizado e purificado. O protocolo PCR (reação em cadeia da polimerase) é utilizado a fim de se examinar expressão de fatores de virulência no RNA. A secreção de leucotoxina é alterada nas bactérias mutantes. A quantidade de leucotoxina secretada foi maior nas bactérias mutantes. O exame do RNA mostrou que a secreção da leucotoxina é feita após transcrição, ou seja, foi regulada pelo antígeno O modificado do LPS da bactéria mutante. A porção alterada do antígeno O da molécula de lipopolissacarídeo da bactéria mutante *A. Actinomycetemcomitans* é capaz de mediar a secreção de leucotoxinas por esta bactéria. Embora o lipídeo seja crítico para o início das respostas imunes a bactérias gram – via ativação do TLR4, a molécula de polissacarídeo antígeno O parece estar envolvida na secreção de proteínas como hemolisina, preotensases e demais fatores de virulência. Porém, isto ainda não foi investigado. Este estudo sugere que a composição ou estrutura do OPS impacte secreção de proteínas seletivas da bactéria.

Lee *et al* (2012) investigaram os efeitos bactericidas e neutralizantes dos linfócitos B (HBD) sobre a bactéria *Enterococcus faecalis* e seu LPS, o principal fator de virulência bacteriano. Linfócitos 1,2,3 e 4 foram sintetizados e purificados. Ácido lipoteico, extraído da bactéria *E. Faecalis* foi diluído a uma solução aquosa e depois liofilizado. Os linfócitos em cultura foram tratados com a bactéria e com o ácido lipoteico liofilizado por 8 horas, a 37°C em uma incubadora com gás carbônico. A fim de se investigar o efeito neutralizante dos linfócitos na atividade da *E faecalis* e de seu ácido lipoteico, utilizou-se análise de citometria de fluxo e o teste ELISA para medição da quantidade de fator de necrose tumoral e interleucina produzidos por eles. Como resultado, todos os HBD'S exibiram efeito neutralizante sobre a atividade do ácido lipoteico da bactéria, sendo que o HBD 3 neutralizou fortemente a atividade da bactéria em estimular a expressão de fator de necrose tumoral e interleucinas. Seis HBD'S têm sido identificados no homem, sendo que os HBD 1, 2, 3 e 4 são produzidos pela polpa dental. Esses, previnem a sepsis e a inflamação induzida pelo ácido lipoteico de bactérias gram + pelo lipopolissacarídeo de bactérias gram -, tendo efeito de neutralização sobre eles na indução de fator de necrose tumoral e interleucinas. Assim, os resultados mostram que a indução dos HBD'S no

hospedeiro podem ter um grande potencial durante a terapia endodontica.

Signoretti *et al* (2011) avaliaram a influencia de clorexidina gel 2% sobre PH, liberação de ions calcio e capacidade do hidroxido de calcio em neutralizar a endotoxina. As pastas foram preparadas (40 amostras de hidroxido de calcio + solução fisiologica 0,9%; 40 amostras de hidroxido de calcio + clorexidina gel 2% e 40 amostras com clorexidina gel 2%). Propulsor de Lentulo foi utilizado para levar as pastas em cilindros de polietileno que tiveram seus orificios selados. 10 tubos vazios, sem medicação foram usados como controle negativo. O ph e a liberação de ions calcio foi verificada após 1, 7, 15 e 30 dias. O PH foi medido com phmetro digital. Quarenta incisivos superiores recém extraidos foram utilizados neste estudo, selecionados atraves de similaridade de dimensões e anatomia. A coroa foi seccionada a fim de padronizar o comprimento radicular em 14mm. O comprimento de trabalho foi determinado 1mm aquem desta medida. Os canais foram preparados até diametro 60 lima tipo K, técnica coroa apice utilizando-se solução irrigadora a base de clorexidina gel 2% seguida de solução salina. Após o preparo, canais foram irrigados com 3ml de EDTA 17% por 3 minutos e irrigados com solução salina. Canais foram secados com pontas de papel absorvente estereis e uma camada de cianoacrilato cobriu a superficie radicular exceto abertura cervical de acesso. As amostras foram esterilizados em autoclave para posteriormente serem contaminadas do solução de endotoxina da *E coli* atraves de uma micropipeta exceto nos 5 dentes que serviriam de grupo controle negativo. Todos os dentes foram selados e incubados a 37 C em atmosfera umida. Apos 24 horas, utilizou-se medicação intracanal nas amostras de dentes, dividindo-se em grupos: 10 dentes com pasta de hidroxido de calcio + solução fisiologica; 10 dentes hidroxido de calcio + clorexidina gel 2%, 10 dentes clorexidina gel 2%, 5 dentes como grupo controle positivo sem medicamento e 5 dentes como grupo controle negativo sem inoculação de endotoxina e sem medicamento. Apos 14 dias, os canais foram novamente acessados e irrigados com 5 ml de agua esteril para remover medicação intracanal, sendo coletadas amostras com uma seringa para posterior analise quantitativa cromogenica ou LAL. Apos incubação para analise, a absorbancia das soluções contendo diferentes concentrações de endotoxina foram medidas individualmente com espectrofotometro. O grupo Hidroxido de calcio + clorexidina gel 2% liberou mais ions calcio que o grupo hidroxido de calcio + solução fisiologica após 14 dias. Esses dois grupos mostraram PH alcalino em todo o tempo do experimento, e o hidroxido de calcio + solução fisiologica mostrou maiores valores de PH após 30 dias. A associação

hidróxido de cálcio + clorexidina 2% e clorexidina 2% mostraram quantidades menores de endotoxina que o grupo que usou pasta de hidróxido de cálcio + solução fisiológica. Como conclusão, a clorexidina não interferiu nas propriedades químicas do Hidróxido de Cálcio, e ao invés disso, melhorou suas propriedades em reduzir o conteúdo de endotoxina dos canais radiculares *in vitro*. Nenhuma das pastas utilizadas foram capazes de remover completamente a endotoxina inoculada nos canais radiculares. A clorexidina não interferiu nas propriedades químicas do Hidróxido de Cálcio e *in vitro*, aprimorou a capacidade do

3. DISCUSSÃO.

3.1 Quanto à flora microbiana.

O fracasso do tratamento endodôntico é caracterizado pela presença de sinais e sintomas da periodontite apical persistente ou emergente após a conclusão do caso.

Kakehashi *et al* (1965) foram os primeiros a mostrar o papel essencial da bactéria e de seus subprodutos no desenvolvimento de lesões periapicais. Nos anos 1970, estudos microbiológicos já mostravam que os dentes com polpa necrosada e lesão periapical tinham predominância de bactérias gram – (SUNDQVIST, 1976). Bactérias e seus subprodutos têm um papel fundamental na iniciação e perpetuação da doença pulpar e periodontal. Ao analisar a microflora de canais radiculares infectados, bactérias anaeróbias gram – são predominantes principalmente durante a fase ativa de expansão da lesão periapical (SCHEIN & SCHILDER, 1975; WITTGOW & SABISTON, 1975; TANIISHII *et al.*, 1994). Essas bactérias carregam endotoxina em sua membrana celular externa (PETSCH & ANSPACH, 2000), também chamada de lipopolissacarídeo bacteriano, que é secretado em vesículas durante o crescimento do micro-organismo ou liberado durante a desintegração da bactéria após a sua morte (NAIR, 2004). Uma vez liberada, a endotoxina pode exercer seus efeitos patológicos pela estimulação de mediadores biológicos como produtos da via da cicloxigenase, produtos da lipoxigenase, fator de ativação plaquetário, interleucinas e fator de necrose tumoral. (BAUM *et al.* 1990, COHN *et al.* 1990, ALEXANDER *et al.* 1991 e 1990, CRESY *et al.* 1991, JENKINS *et al.* 1991). Endotoxinas são responsáveis por diversos efeitos biológicos (WESTPHAL, 1975; YAMASAKI *et al.*, 1992; RIETSCHEL *et al.*, 1992; SAFAVI & NICHOLS, 1993 e 1994; BARTHEL *et al.*, 1997; MORSE, 1981; FABER & SELTZER, 1988; SILVA *et al.*, 2002; NELSON-FILHO *et al.*, 2002; JIANG *et al.*, 2003), tais como quimiotaxia de leucócitos polimorfonucleares, liberação de colagenase, ativação de macrófagos, liberação de produtos do ciclo da cicloxigenase, de ativador plaquetário, de fator de necrose tumoral, interleucinas, radicais livres, ácido nítrico, interferon, ativação do sistema complemento e de B linfócitos, febre e ativação de osteoclastos (MORSE, 1981), importantes para manutenção da reação inflamatória e reabsorção óssea de região periapical (WANG *et al.*, 1993). A endotoxina de bactérias vivas ou mortas, inteiras ou fragmentadas age sobre macrófagos, neutrófilos e fibroblastos, havendo liberação de um grande número de

mediadores químicos bioativos ou citocinas tais como fator de necrose tumoral, interleucinas e prostaglandinas. Fortes evidências correlacionaram o LPS a reações inflamatórias e reabsorção ósseas em tecido perirradicular (DAHLEN *et al.*, 1981; NELSON-FILHO *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2002; PITTS *et al.*, 1982). O alcance do LPS via forame para tecido perirradicular pode perpetuar periodontite apical (DAHLEN *et al.*, 1981; SILVA *et al.*, 2002; BARTHEL *et al.*, 1997). O papel fundamental das bactérias na etiologia das lesões endodônticas tem sido estudadas desde 1965 (KAKEHASHI *et al.*, 1965). Tani-Ishii *et al.* (1994) caracterizou a microflora presente no canal radicular durante fase ativa de desenvolvimento da lesão em modelo animal e mostrou que a predominância é de bactérias anaeróbicas restritas gram -, com predomínio de *Prevotella*, *Peptostreptococcus*, *Bacterioides* e *Neisseria*. Bactérias Gram - contêm endotoxina na porção mais externa da membrana celular (PETSCH *et al.*, 2000). Muitos autores relataram o papel importante da endotoxina na patogenia de lesões periapicais (BARTHEL *et al.*, 1997; DWYER *et al.*, 1981; PITTS *et al.*, 1982; YAMASAKI *et al.*, 1992). Dahlen *et al.* (1981), Nelson-Filho (2002) e Silva *et al.* (2002) estudaram os efeitos da endotoxina em tecido periapical de cães e macacos. Foi observada reação inflamatória e reabsorção óssea em todos os dentes experimentados.

A endotoxina é o principal fator de virulência envolvido no desenvolvimento de lesões periapicais (NELSON-FILHO *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2004; PITTS *et al.*, 1982), ativando o sistema imune do hospedeiro, liberando uma variedade de mediadores pré-inflamatórios (PITTS *et al.*, 1982; HORIBA *et al.*, 1991; HONG *et al.*, 2004; MARTINHO *et al.*, 2010).

3.2 A interação microbiana.

Lipopolissacarídeo é uma macromolécula essencial que compreende a superfície externa da bactéria gram -. Lipopolissacarídeo, reconhecido pelo corpo do hospedeiro como uma molécula estranha, induz a uma resposta imune que é desenvolvida para eliminar a bactéria intrusa. Isso acontece devido ao fato de que, em nível molecular, o lipídeo A componente bioativo do lipopolissacarídeo, é um forte agonista do receptor de resposta imune inata TLR4. O lipopolissacarídeo é a maior macromolécula encontrada na superfície mais externa da bactéria gram -. A indicação da bactéria gram - é seu envelope, que consiste de duas membranas, uma mais externa e outra mais interna, envolvidas entre si por um espaço periplasmático. Cada membrana é composta de uma

camada dupla assimétrica fosfolípidos, proteínas e lipopolissacarídeos, o LPS (RAETZ & WHITFIELD, 2002), formando folhetos. Ambos os folhetos lipídicos da membrana interna, circundados pelo citoplasma, são compostos de fosfolípidos. A membrana mais externa da bactéria, é uma bicamada lipídica assimétrica que consiste de fosfolípidos, no folheto mais interno e lipopolissacarídeo, incluindo sua porção mais importante, o lípido A, no folheto mais externo. Lipopolissacarídeo é crítico para as bactérias para manutenção da integridade de sua estrutura e por estabelecer uma barreira de permeabilidade seletiva que limita a entrada de moléculas hidrofóbicas e tóxicas como detergentes e antibióticos. Lipopolissacarídeo é necessário para conexão e ligação de muitas proteínas de membrana. Tendo em vista todas essas propriedades, não é surpresa que o lipopolissacarídeo é essencial para a sobrevivência de muitas bactérias gram –.

O LPS de bactérias gram – está localizado na membrana celular mais externa e é composto de 3 regiões distintas; o polissacarídeo específico, o corpo e o componente lipídico, chamado de lípido A. O lípido A é o componente mais interno mais importante. Tem sua estrutura protegida e forma o folheto externo da membrana externa. O antígeno O é o componente externo mais importante do lipopolissacarídeo e forma a superfície externa da bactéria. O antígeno O tem uma estrutura altamente variável e induz fortemente o sistema imune. Este é o responsável por muitos, se não todos, os efeitos biológicos exibidos pela bactéria - toxicidade, febre, ativação de macrófagos e do sistema complemento. O lípido A, porém, é inativado a mínima modificação de sua estrutura.

A constituição principal do lípido A é glucosamina, fosfato e ácidos graxos hidroxilados. Essa cadeia de ácidos graxos é única e onipresente a cada LPS. O ácido mirístico constitui uma porção substancial do LPS da *Salmonella typhimurium*, por exemplo.

Lipopolissacarídeos são moléculas predominantes na superfície bacteriana e são importantes para a viabilidade e estabilidade da membrana da bactéria gram - (RAETZ & WHITFIELD, 2002). Tem sido sugerido atualmente que o LPS está envolvido com a difusão lateral de proteínas de membrana (JAIN et al., 2006; STRAATSMA & SOARES, 2009), secreção proteica (WANDERSMAN & LETOFFE, 1993; BULIERIS et al., 2003; BENGOCHEA et al., 2004), controle da atividade biológica das proteínas (STANLEY et al., 1993; IREDELL et al., 1998).

O termo LPS não denota um único tipo de molécula mas caracteriza moléculas de cadeia heterogênea de diferentes comprimentos diferentes para cada espécie bacteriana.

O receptor para lipopolissacarídeos é um complexo proteico que consiste em TLR4,

MD2 e CD14. Este complexo proteico é presente em diversos tipos de células incluindo células imunes macrófagos e células dendríticas. Uma proteína acessória, a proteína de ligação do lipopolissacarídeo é necessária para o reconhecimento do lipopolissacarídeo. A proteína de ligação do lipopolissacarídeo converte micelas oligoméricas do lipopolissacarídeo para a forma monomérica e entrega isso ao CD14, que faz a ligação ao complexo MD2-TLR4. A ligação do lipopolissacarídeo a este complexo, induz a uma cascata de sinalização intracelular, que resulta em liberação de inúmeras citocinas, incluindo fator de necrose tumoral alfa, interleucina 1B, 6 e 8. A liberação destas citocinas tem sido relacionada como fator etiológico de uma ampla gama de patologias incluindo desde sintomas brandos como febre e letais como choque séptico ou choque endotóxico, insuficiência dos órgãos e morte. O propósito das proteínas liberadas do sistema de defesa após reconhecimento do lipopolissacarídeo pelo complexo TLR4-MD2-CD14 é tanto eliminação quanto eliminação das bactérias. Por exemplo, interleucina 1B contribui para o aumento da expressão de fatores de adesão nas células endoteliais para permitir transmigração de leucócitos. A interleucina 8 é um quimiotático de neutrófilos. Quando a resposta imune inata se torna descontrolada, o organismo do hospedeiro é levado ao dano, desenvolvendo patologias.

O mecanismo geral no qual o sistema imune detecta invasão microbiana é pelo reconhecimento de padrões moleculares comuns a uma variedade ampla de diferentes micróbios. O hospedeiro envolve receptores próprios que reconhece estruturas comuns, resultando em resposta imune inata imediata inespecífica e eficiente. O lipídeo A por exemplo satisfaz essa categoria, sendo um padrão molecular associado a um patógeno presente em quase todas as bactérias gram – conhecidas (*Neisseria meningitidis* é uma exceção).

O LPS da *F. nucleatum* e do LPS da *P. Endodontalis* se aprimoram entre si. Isso explica o porquê que infecções bacterianas combinadas no sistema de canais radiculares induzem a perda óssea mais severa. Ou seja, as interações in vivo de uma população mista de bactérias pode ser mais complexa que nos modelos in vitro. Ao contrário disto, foi demonstrado que o LPS da *B. Fragilis* diminuiu significativamente a adesividade do LPS da *E. Coli* (MAGNUSON *et al*, 1989). É preciso ter em mente que componentes não-LPS de bactérias também podem estimular a reabsorção óssea pelas citocinas (HENDERSON *et al.*, 1995 e 1996) tais como lipoproteínas, peptídeo-glicanas e polissacarídeos capsulares. Os efeitos do Hidróxido de Cálcio como medicação podem variar em diferentes moléculas de LPS pois cada espécie gram – produz seu próprio

lipopolissacarideo. A combinação de espécies gram – indica que diferentes LPS com diferentes toxicidades de lipídeo A podem estar envolvidos em casos de infecção e podem até mesmo inibir a antigenicidade entre eles em tecidos periapicais. Por exemplo, o LPS da *P. Endodontallis* parece aprimorar a toxicidade do LPS da *F. Nucleatum*.

De acordo com Berkiten *et al* (2000), profundidade de alcance de bactérias gram – é de no máximo 250 µm, enquanto que a capacidade de alcance do LPS chega a 800 µg, representando aproximadamente um alcance 4 vezes maior que uma invasão bacteriana. Isso se deve ao peso molecular do lipopolissacarideo, muito baixo. Essas substâncias são capazes de penetrar e se difundir através dos tubulos dentinários, alcançando o cemento em um período de 24 horas (OLIVEIRA *et al.*, 2005). Em teoria, a instrumentação do canal radicular finalizada em alargamento apical 3 instrumentos maiores que o diâmetro anatômico pode deixar para trás mais de 50% de dentina infectada! Tal afirmação é consistente em decorrência da quantidade de endotoxina restante coletada após o preparo químico mecânico (>47%). Um alargamento maior que 500 µm pode se fazer necessário para remoção otimizada da maior quantidade de endotoxina possível. Entretanto essa manobra pode não ser compatível com a maioria dos casos, em decorrência da limitação de alargamento (grau de curvatura, diâmetro da curvatura e espessura mesio distal das raízes). A limpeza e a desinfecção do sistema de canais radiculares são fundamentais para o tratamento da polpa necrosada, não devendo somente eliminar micro-organismos mas eliminar a endotoxina (SILVA *et al.*, 2002). Após o preparo químico mecânico, micro-organismos e endotoxinas podem persistir no canal radicular, exigindo o uso de medicação intracanal que deve agir sobre a dentina e lacunas de reabsorção, áreas dificilmente acessadas durante o preparo químico mecânico.

Quando livre, a endotoxina não causa nenhum dano tecidual ou celular, mas consegue estimular células competentes a liberarem mediadores químicos. Macrófagos são o alvo principal da endotoxina. Após ser liberado do corpo da bactéria, o LPS inicialmente é unido a uma proteína plasmática chamada proteína de ligação do LPS até ser entregue a um outro receptor para LPS agora na superfície de macrófagos. A subsequente ativação do macrófago é um resultado da ativação de um sinal de gatilho, chamado TLR ou toll like receptor. Os TLR's são proteínas conservadas durante a evolução caracterizadas por um domínio repetitivo de leucinas e um receptor intracelular. O padrão repetitivo de leucinas interligadas é encontrado tanto nas proteínas do citoplasma quanto nas proteínas transmembranas e é envolvido no reconhecimento do

ligante e transdução de sinal. O LPS ativa o fator de Hagerman da cascata de coagulação e da produção de bradicininas ativa o sistema complemento, induz a expressão de leucocitos a adesão de moléculas nas células endoteliais, diferenciação de osteoclastos e reabsorção ossea. O LPS pode ser mitogênico a células B de defesa e células epiteliais. Wadachi & Hargreaves (2006) propuseram um mecanismo de dor associado a infecção endodôntica. Eles demonstraram que neurônios aferentes do ganglio trigeminal expressaram o receptor TLR 4 e que o LPS pode iniciar sinalização de cascatas intracelulares, levando a uma liberação periférica de neuropeptídeos e neurotransmissores.

A *Porphyromonas gingivalis* é um micro-organismo não fermentativo gram negativo, anaeróbio restrito que tem como nicho ecológico primário a cavidade oral e é muito conhecida por sua importância como patógeno periodontal. Entretanto, este micro-organismo é frequentemente presente em infecções do sistema de canais radiculares e outros abscessos odontogênicos. *P. gingivalis* é encontrado em 30% dos dentes com infecções primárias associadas a sintomas dolorosos (ROCAS et al., 2002). Além disso, há uma associação positiva entre *Porphyromonas spp* e dor, alodinia, edema e exsudatos purulentos vindos dos canais radiculares (GOMES et al., 2004; JACINTO et al., 2006)

A *P. gingivalis* mantém um grande número de fatores de virulência determinantes, incluindo projeções de fibras, hemaglutinina, cápsula, vesículas de membrana, enzimas hidrolíticas, lipopolissacarídeos. Esses fatores de virulência podem iniciar um mecanismo de defesa no hospedeiro, levando a destruição tecidual. Ao longo desses fatores, LPS é um potente estimulante ao iniciar resposta do sistema imune do hospedeiro contra infecções de bactérias gram -. O LPS media sua ação biológica através da ativação do receptor TLR4 e agrupa a diferenciação do receptor 14 – CD14. Logo, células do hospedeiro que expressam TLR 4 e/ou CD14 tem potencial para detectar LPS bacteriano.

Schein & Schilder (1975) demonstraram que dentes com polpa necrosada tinham grandes concentrações de endotoxinas quando comparados com dentes com polpa vital. Dentes sintomáticos também tem uma quantidade maior de endotoxina que dentes assintomáticos.

3.3 A formação da lesão.

Khabbaz *et al* (2001 e 2001) mostrou presença de endotoxina em lesões cáries de dentes sintomáticos e assintomáticos e em tecido pulpar de dentes cariados, sugerindo

que o LPS pode ter um papel importantíssimo na patogenese da doença pulpar.

Dahlen em 1980, introduziu LPS na camara pulpar de dentes de camundongos e após 3 semanas observou serum com anticorpos. Em outro experimento em 1981, Dahlen *et al* aplicaram LPS em canais radiculares de dentes de macacos. Após 3 e 7 meses, observou-se perda ossea, reação inflamatória e reabsortiva em todos os dentes experimentados. O mesmo ocorreu com os trabalhos de Schein and Schilder (1975), Horiba *et al.* (1991), em que foi notado também sintomatologia dolorosa. Mais tarde observou-se que um fator de virulência microbiano é necessário para iniciação e perpetuação de lesões periapicais *in vitro* (DWYER & TORABINEJAD, 1981; PITTS *et al.*, 1982; MATTISON *et al.*, 1987; YAMASAKI *et al.*, 1992). Assim, sendo o foco do tratamento endodôntico de um dente com periodontite apical a remoção das bactérias do sistema de canais radiculares, por meios mecânicos e químicos, a presença de endotoxinas pode perpetuar a doença periodontal. (BYSTROM *et al.*, 1985, 1987; ORSTAVIK *et al.*, 1991).

Lesão periapical começa com infecção bacteriana na polpa dental com subsequente reabsorção inflamatória do osso alveolar. O acúmulo de componentes bacterianos tal como o lipopolissacarídeo ou LPS em uma área infectada pode estimular liberação de citocinas de macrófagos, neutrófilos e monocitos (WILSON *et al.*, 1996.) tais como interleucinas e fatores de necrose tumoral que iniciam e perpetuam a cascata inflamatória levando a destruição tecidual (UNEMORI *et al.*, 1994). Macrófagos são ativados fortemente pelo conteúdo endodôntico.

O osso é continuamente formado e continuamente reabsorvido a fim de se manter seu volume adequado e homeostasia de íons cálcio circulantes em vertebrados durante toda a sua vida. Osteoblastos e osteoclastos são células especializadas responsáveis pela formação e reabsorção óssea. A remodelação óssea depende da coordenação cuidadosa da quantidade de osso reabsorvido e quantidade de osso depositado. O processo de remodelação óssea é controlado por uma ampla variedade de fatores sistêmicos, incluindo hormônios e fatores locais como prostaglandinas, leucotrienos, citocinas e fatores de crescimento. Um desequilíbrio sobre este processo resulta em desregulação do processo de remodelação óssea. Por exemplo, uma excessiva atividade osteoclastica, leva a perda óssea. Reabsorção óssea patológica, associada a idade e tumor ou a infecção bacteriana pode resultar em diversas doenças. Infecção bacteriana é um importante fator de perda óssea patológica sobre condições inflamatórias (NAIR *et al.*, 1996). Doenças comuns que induzem a perda óssea, tais como periodontite, cistos

odontogênicos, artrite bacteriana, osteomielite, osteíte, doença de Pott ou implantes ortopédicos infectados, são todas em decorrência de infecção bacteriana. O lipopolissacarídeo LPS, um componente da parede celular de bactérias anaeróbias gram- é um bem conhecido e importante patógeno presente em perdas ósseas inflamatórias. LPS pode induzir a produção de diversas citocinas e mediadores químicos em macrófagos tais como fator de necrose tumoral A, interleucinas e prostaglandinas, importantes para a maturação de osteoclastos. Além disso, o LPS pode iniciar a formação de osteoclastos e facilitar a fusão e a sobrevivência deles.

Durante a reabsorção óssea, a enzima metaloproteinase degrada a porção não mineralizada da matriz extracelular (DELAISSE *et al.*, 1993; FULLER *et al.*, 1995). Ocorre estimulação de osteoclastogênese pela metaloproteinase durante degradação de colágeno da matriz. Em trabalhos anteriores (LIN *et al.*, 1997 e 2002) foi demonstrado a expressão pronunciada do gene de produção da metaloproteinase em macrófagos, nos casos de cisto radicular e lesão periapical induzida em ratos. A presença de macrófagos que expressam esse gene para produção de metaloproteinase nas áreas de reabsorção óssea aumenta consideravelmente quando a lesão expande, implicando no envolvimento destes para desenvolvimento de lesão periapical. A conexão entre o LPS e o desenvolvimento da lesão periapical/reabsorção óssea ainda é controversa. Uma correlação positiva entre LPS e desenvolvimento/presença de lesão periapical tem sido frequentemente relatada (SUNDQVIST, 1992; YAMASAKI *et al.*, 1992; MATTISON *et al.*, 1987), na qual lipopolissacarídeos estimulam macrófagos a liberarem citocinas tais como Fator de Necrose Tecidual e Interleucinas (BARTHEL *et al.*, 1997; MATSUSHIDA *et al.*, 1999) que são importantes para o início do processo e manutenção da resposta inflamatória e reabsorção óssea periapical. A aplicação direta de LPS na polpa dental induziu a uma perda óssea proeminente em dentes de cães (MATTISON *et al.*, 1987). Alguns autores discutiram sobre ação do LPS na reabsorção óssea em modelos animais em que as lesões periapicais conseguiram causar perda óssea ao mesmo tempo que o inibidor do LPS não conseguiu abrandar sua atividade osteolítica (STASHENKO *et al.*, 1992). A hipótese sugerida é que o LPS liberado de canais radiculares infectados estimulam os macrófagos a secretarem interleucina e fator de necrose tumoral, que por sua vez, induzem a síntese de metaloproteinase e subsequente reabsorção óssea. Em suma, LPS induz a reabsorções ósseas pela estimulação da liberação de mediadores osteolíticos tais como interleucina 1A e fator de necrose tumoral A, que são citocinas pré inflamatórias que modulam a subsequente produção de metaloproteinase dos

macrófagos, promovendo perda óssea. Macrófagos acumulados em áreas de reabsorção óssea podem servir de células progenitoras de osteoclastos. (MATTISON *et al.*, 1987).

É sabido que o LPS desempenha um papel fundamental na estimulação de síntese e liberação das principais citocinas ativadoras de atividade osteoclastica, a chamada interleucina 1 e o fator de necrose tumoral A, liberados das células imunes. O LPS bacteriano estimula as células do hospedeiro a liberarem prostaglandinas, que mostram influência em mediar atividade osteoclastica. Qualquer LPS remanescente no canal radicular pode potencialmente afetar tecidos periapicais durante a infecção endodôntica ou até mesmo após diminuição/neutralização da carga bacteriana após o preparo. Sabe-se que os monócitos e outras células imunes têm excelente sensibilidade ao LPS, e como resultado, o LPS pode exercer efeitos significativos no tecido do hospedeiro. O LPS residual nos canais radiculares pode trazer grandes consequências clínicas no tratamento endodôntico.

As quimiocinas, um grupo diverso de pequenas citocinas quimiotáticas, estão envolvidas na modulação de atração, desenvolvimento e função, tanto fisiológica quanto patológica dos osteoclastos (VOTTA *et al.*, 2000; LEAN *et al.*, 2002; YU *et al.*, 2003; WATANABE *et al.*, 2004; WRIGHT *et al.*, 2005). Uma quimiocina de particular interesse é o fator 1 celular derivado do estroma (SDF-1) que controla diversos processos homeostáticos, de desenvolvimento e patológicos através da interação com seu único receptor (CXCR4) (TACHIBANA *et al.*, 1998; ZOU *et al.*, 1998). SDF-1 é essencial para o desenvolvimento do sistema imune, hematopoiético, circulatório e nervoso central (WRIGHT *et al.*, 2005). Osteoblastos imaturos, células medula óssea e células do endotélio vascular intraósseo expressam um alto índice de SDF-1 continuamente. Diversas citocinas tais como interleucina 1B, prostaglandinas, fator de crescimento do endotélio vascular (potente vasodilatador) e fator de necrose tumoral regulam a produção de SDF-1 nos osteoblastos (JUNG *et al.*, 2006). SDF-1 tem sido reconhecido como um crítico fator fisiológico para a organização celular hematopoiética na medula óssea e sua subsequente localização, retenção, desenvolvimento e sobrevivência nos estromas apropriados. Seu receptor CXCR4 é expresso pelos pre osteoclastos (YU *et al.*, 2003). Além disso, SDF-1 parece estar envolvido em promover quimiotaxia, desenvolvimento precoce, fusão celular, reabsorção óssea e sobrevivência de osteoclastos sobre condições fisiológicas e durante inflamação crônica (WRIGHT *et al.*, 2005).

Endotoxinas têm uma vasta variedade de potentes propriedades biológicas e o homem é mais sensível a seus efeitos que qualquer outro mamífero (DWYER &

TORABINEJAD, 1981). As endotoxinas agem farmacologicamente para o aumento da permeabilidade capilar e inflamação. A porção lipoproteica é um potente antígeno que pode induzir a formação de anticorpos em quantidades muito pequenas. Quando um antígeno se localiza no interior do canal radicular, esse pode alcançar região periapical e causar uma sensibilização sistêmica e formação de anticorpos.

Há três mecanismos básicos na qual a endotoxina pode desempenhar um papel na formação de lesão periapical:

1. *Ativação do sistema complemento* através da formação antígeno-anticorpo.
2. *Ativação do sistema complemento* pela própria endotoxina através do lipídeo A, onde os componentes são ativados e clivados, liberando peptídeos que mediam reação inflamatória que possibilita reabsorção óssea.
3. Por si só, é um potente agente inflamatório que quando introduzido localmente induz a uma dramática resposta inflamatória, estimulando resposta osteoclástica.

Deve-se considerar que a ação e propriedades inflamatórias e tóxicas do LPS culminam com a existência da lesão periapical de caráter inflamatório.

Dentes com infecção endodôntica primária têm níveis mais altos de endotoxina e uma comunidade de bactérias gram – muito complexa quando comparados com dentes com infecção secundária (GOMES *et al.*, 2012). A infecção primária é polimicrobiana, causada predominantemente por bactérias gram -, especialmente *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Treponema* e *Fusobacterium* (GOMES *et al.*, 2012). Estudos clínicos correlacionaram endotoxina e presença de periodontite apical (NELSON-FILHO *et al.*, 2002; HORIBA *et al.*, 1991; VIANNA *et al.*, 2009; GOMES *et al.*, 2009; MARTINHO *et al.*, 2010) e também altos índices de endotoxina com desenvolvimento de sinais e sintomas e ampla área de destruição óssea (NELSON-FILHO *et al.*, 2002; HORIBA *et al.*, 1991; MARTINHO *et al.*, 2010; VIANNA *et al.*, 2009; GOMES *et al.*, 2009).

Para Kerschull & Papapanou (2011), a *Porphyromonas gingivalis* é uma bactéria anaeróbica gram – associada a severa inflamação e destruição de tecido periodontal, sendo um dos patógenos mais virulentos. A *Porphyromona gingivalis* exacerba a produção de citocinas e proteases (enzimas) da matriz extracelular, suprimindo o sistema imune e controlando apoptose de várias células incluindo macrófagos. As células endoteliais, em resposta a agressão/injúria também podem produzir citocinas ou entrar em apoptose, após estimulação do LPS.

O mecanismo pelo qual o LPS contribui para reação inflamatória inicial e

reabsorção ossea periapical parece estar relacionado a expressão do TLR2 (MUTOH *et al.*, 2007) e TLR4 (MUTOH *et al.*, 2007; JIANG *et al.*, 2006) na polpa e odontoblastos, bem como capacidade de estimular macrófagos para liberar citocinas como fator necrosante (BARTHEL *et al.*, 1997) e interleucinas (MATSUSHITA *et al.*, 1999).

O desenvolvimento de lesões periapicais cria uma barreira dentro do corpo do hospedeiro a fim de se evitar a disseminação de micro-organismos. O tecido osseo é reabsorvido e substituído por um tecido granulomatoso que contém elementos de defesa tais como fagócitos e moléculas de anticorpos (SIQUEIRA, 1997). Uma densa parede de leucócitos polimorfonucleares ou menos frequentemente, um plug epitelial geralmente está presente no forame apical bloqueando o egresso de micro-organismos para a região perirradicular (NAIR, 1987). Poucos patógenos conseguem avançar por essa barreira. Entretanto, produtos microbianos podem se difundir através dela e capacitar a indução ou perpetuação de doença perirradicular. Culturas microscópicas recentes mostraram o interesse nesse aspecto extraradicular, tanto em dentes tratados como em dentes não tratados (TRONSTAD *et al.* 1987; TRONSTAD *et al.* 1990; IWU *et al.* 1990; WAYMAN *et al.* 1992; LONÇALI *et al.* 1996; SIQUEIRA & VENTURIN, 1997). Uma vez que esses microorganismos atingem tecido perirradicular, eles ficarão inacessíveis aos procedimentos de desinfecção endodôntica e podem ser um fator em potencial para o fracasso. *Actinomyces spp.* e *Propionibacterium propionicum* são as espécies mais implicadas na infecções extraradiculares (SUNDQVIST *et al.*, 1980; NAIR, 1984; HAPPONEN, 1986; SJOGREN, *et al.* 1988, SAKELLARTOU, 1996). A organização também é em biofilmes nos casos de infecção extraradicular, como nas infecções intraradiculares, sob um substrato orgânico ou inorgânico, circundado por uma matriz de produtos microbianos (SIQUEIRA & LOPES, 1998). Organizados em biofilmes, os micro-organismos mostram alta resistência aos agentes antimicrobianos e aos mecanismos de defesa do hospedeiro, quando comparados às suas mesmas formas só que planctônicas.

De acordo com Coon (2007), a reabsorção óssea inflamatória é um processo patológico associado à periodontite apical crônica. A infecção bacteriana é a causa primária da doença endodôntica e subsequente absorção óssea inflamatória na região perirradicular. Células bacterianas e componentes de suas estruturas tais como LPS iniciam uma série de reações inflamatórias e imunológicas que levam ao desenvolvimento e progressão da reabsorção óssea perirradicular. Citocinas inflamatórias tais como interleucina 1, fator de necrose tumoral A e prostaglandinas desempenham um papel importante na ativação e formação de osteoclastos que mediam a reabsorção óssea.

Prostaglandinas são uma família de citocinas com um amplo alcance patológico e biológico como por exemplo como manutenção da homeostasia tecidual e mediação da resposta inflamatória. Cicloxigenase é uma enzima responsável pela conversão do ácido araquidônico em prostaglandina E2. Existem ao menos duas isoformas de COX: a COX 1 que é responsável pela produção de prostaglandinas durante a homeostasia tecidual e a COX 2 que é uma enzima induzível responsável pela produção das prostaglandinas em processos inflamatórios. Mediadores inflamatórios incluindo interleucina 1, fator de necrose tumoral α , fatores de crescimento, LPS, e células tumorais são estimuladores muito conhecidos de COX 2. O aumento na produção de prostaglandinas E2 tem sido demonstrado em lesões perirradiculares; e isso tem sido sugerido pela atividade de reabsorção óssea. Os níveis de prostaglandina E2 no exsudato do canal radicular são extremamente correlacionados aos sintomas clínicos da doença endodôntica, especialmente pela ocorrência de dor. Altos níveis de prostaglandinas E2 são frequentemente ligados a periodontite perirradicular aguda e dolorosa. Além disso, a inibição da síntese de prostaglandina E2 resulta na supressão do processo inflamatório alterando a reabsorção óssea em modelos experimentais animais. O uso de inibidores seletivos de COX 2 tem mostrado resultados promissores no alívio da dor durante o tratamento endodôntico. Periodontite perirradicular é comumente conduzida com o tratamento endodôntico não cirúrgico. Este tratamento envolve limpeza, modelagem e obturação do sistema de canais radiculares que selam o canal eliminando bactérias prevenindo infiltrações e promovendo a cura. Reabsorção óssea inflamatória é um processo complexo que envolve muitas citocinas e cruzamentos entre diferentes tipos de células. O tipo principal de célula envolvido na reabsorção óssea é o osteoclasto. A osteoclastogênese envolve interações entre osteoblastos e células do estroma ósseo e osteoclastos progenitores. Estas interações são mediadas por moléculas chave como os receptores RANKL. O RANKL é expressado pelas células osteoblásticas como fator de membrana associado. RANKL se liga a RANK que é um receptor de RANKL expressado pelos osteoclastos progenitores. A interação RANK – RANKL estimula a diferenciação dos osteoclastos progenitores em osteoclastos maduros. O RANKL induz os precursores de osteoclastos em osteoclastos maduros que reabsorvem o osso. O LPS por sua vez, estimula células que expressam RANKL a formarem osteoclastos ativos. A porção de lipídio A do LPS é a maior fonte de bioatividade. O LPS é necessário para a formação de osteoclastos induzida pelo LPS em culturas. O LPS é um fator etiológico importante que contribui para o desenvolvimento e progressão da reabsorção óssea inflamatória

perirradicular. Materiais endodônticos e LPS podem estar em contato direto com o tecido perirradicular e podem contribuir para o processo da doença nessa região. O tratamento com o LPS causou um aumento muito pronunciado na formação de osteoclastos. Este resultado está de acordo com estudos anteriores e é consistente com o que é conhecido a respeito do efeito LPS como um indutor em potencial para reabsorção óssea. Na ausência de prostaglandinas E2, a formação de osteoclastos em resposta ao LPS foi significativamente menor. Isso sugere que a prostaglandina E2 mediada pela COX2 é necessária para a osteoclastogênese induzida pelo LPS. O LPS estimulou a produção a produção de prostaglandina E2 que é responsável pelo aumento da formação de osteoclastos. Estas afirmativas também suportam a hipótese de que uma diminuição na produção de prostaglandina E2 através do uso de inibidores de COX2 pode ter um efeito inibitório na reabsorção óssea inflamatória causada por componentes bacterianos. A produção de prostaglandina E2 mediada pela COX2 é necessária para a indução da reabsorção óssea pelo LPS durante uma infecção bacteriana. Este mecanismo é independente da interação RANK-RANKL. O uso de inibidores de COX 2 em pacientes durante o tratamento endodôntico pode fornecer benefícios adicionais de inibição da reabsorção óssea inflamatória e dor.

3.4 O papel do preparo do canal.

Doenças endodônticas são bem conhecidas como resultado das interações da resposta imune do hospedeiro e bactérias patogênicas presentes no interior dos canais radiculares. Canais infectados agem como uma fonte de espécies patogênicas, fatores de virulência e mediadores inflamatórios que se espalham pelo tecido periapical criando e sustentando reação crônica inflamatória (NAIR, 2004)

A eliminação de micro-organismos do sistema de canais radiculares por agentes antimicrobianos tem sido uma meta fundamental no tratamento endodôntico (BYSTROM *et al.*, 1983), porém, em tratamentos de dentes com polpa necrosada, a preocupação não deve ser somente com a morte da bactéria mas também com a inativação da endotoxina (NELSON-FILHO *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2002). Os micro-organismos são a causa da periodontite apical (KAKEHASHI *et al.*, 1965; MOLLER *et al.*, 1981, SUNDQVIST, 1992). Infelizmente, a completa eliminação das bactérias somente pela instrumentação/preparo do canal radicular não acontece (BYSTROM & SUNDQVIST, 1981; WU *et al.*, 2006). Além disso, uma forma de irrigação e desinfecção é necessária para neutralizar e remover

microrganismos e seus subprodutos, além de debris, resto orgânicos do sistema de canais radiculares. Endotoxinas assim como as bactérias são capazes de se difundirem através dos tubulos dentinários, que estão presentes não só no lúmen mas em todo o sistema de canais radiculares. (NISSAN *et al.*, 1995; OLIVEIRA *et al.*, 2003)

O objetivo principal do tratamento endodôntico é a eliminação de bactérias do sistema de canais radiculares pelo preparo químico mecânico e para isto, uma ampla variedade de agentes antimicrobianos tem sido usados para esta finalidade. Entretanto, é possível que mesmo que bactérias sejam removidas do canal radicular, a endotoxina é capaz por si só de manter ou induzir a periodontite apical (BARTHEL *et al.*, 1997), interferindo no resultado do tratamento. O preparo biomecânico do canal radicular só reduz parcialmente a microbiota endodôntica, não elimina bactérias de todo o sistema de canais radiculares e não age sobre o LPS (BUTLER & CRAWFORD, 1982; BUCK, 2001). O uso da medicação intracanal é considerado necessário por muitos. A inativação do LPS pelo Hidróxido de Cálcio é mostrado nos estudos *in vitro* (SAFAVI & NICHOLS, 1993 e 1994; BARTHEL, 1997 e SILVA *et al.* 2002). A meta do tratamento endodôntico é a prevenção ou resolução de uma periodontite apical. Considerando que o fator etiológico para a doença periapical são os micro-organismos (KAKEHASHI *et al.* 1965; SUNDQVIST, 1976), as modalidades de tratamento proposto se focam na desinfecção do canal radicular através do preparo químico mecânico e uso do hidróxido de cálcio. Embora os efeitos bactericidas do hidróxido de cálcio tenham sido exaustivamente relatados na literatura, é aceitável que seu efeito de reparo sobre região periapical seja dependente de outros mecanismos também. Um potente mecanismo pelo qual o hidróxido de cálcio tem ação é a inativação da endotoxina residual no lúmen e na dentina adjacente ao canal radicular. Está bem estabelecido que as bactérias predominantes envolvidas nas infecções endodônticas são espécies gram – anaeróbicas, que contêm endotoxina na parede externa de membrana (RIETSCHEL & BRADE, 1992).

Para Marinho *et al.* (2012), há forte correlação entre o LPS presente na membrana celular de bactérias gram – e a presença de sintomatologia clínica e periodontite apical. A endotoxina, até mesmo em baixíssimas concentrações, estimula as células do hospedeiro a liberarem citocinas pró inflamatórias, relacionadas com o desenvolvimento e manutenção da resposta inflamatória, incluindo reabsorção óssea.

Gomes *et al.* (2009) avaliaram o preparo químico mecânico com limas manuais e clorexidina gel 2% e hipoclorito de sódio 2,5% como substâncias auxiliares de irrigação para remover a endotoxina de canais infectados. Apesar da alta atividade antimicrobiana

dessas substâncias, nenhuma das duas foi efetiva em eliminar a endotoxina. Os autores relataram diminuição de 47% somente na quantidade de endotoxina, fato que foi associado a ação mecânica dos instrumentos nas paredes dentinárias acompanhado de irrigação inundação dos canais pela substância auxiliar de irrigação.

Apesar do alargamento apical, a endotoxina é detectável em 100% dos canais radiculares infectados após a instrumentação. (GOMES *et al.*, 2009) Se uma quantidade residual de endotoxina é capaz de induzir a uma resposta inflamatória, não é sabido. Teoricamente, na ausência de bactérias gram – vivas para manter o nível de LPS em tecido periapical, o efeito desses níveis residuais de LPS deixados para trás após instrumentação pode temporariamente modular reação de defesa do hospedeiro sem prejudicar o tratamento endodôntico.

Uma série de investigações tem mostrado que a causa da falha no tratamento endodôntico pode ser devido permanência de microorganismos em terço apical e/ou além da região foraminal (NAIR, 2004; ROCAS *et al.*, 2010). Alguns estudos (NOIRI *et al.*, 2002) mostram que a bactéria pode formar uma estrutura de biofilme invadindo a região extraradicular a partir do forame apical, ligando-se ao cimento ao redor do ápice. Esses micro-organismos são resistentes a fagocitose e medicamentos, além de seus subprodutos iniciarem uma resposta de defesa, resultando em infecção persistente. Essas bactérias são inacessíveis tanto ao sistema de defesa do hospedeiro quanto a antibióticos.

As bactérias predominantes detectadas no estudo de Signoretti *et al* (2011) foram: *Actinomyces naeslundii* and *Actinomyces meyeri*, *Propionibacterium propionicum*, *Clostridium botulinum*, *Parvimonas micra*, and *Bacteroides ureolyticus*. Em outro estudo de Leonardo *et al* (2002), os gêneros mais comuns detectados foram: *Staphylococcus*, *Propionibacterium*, *Prevotella*, *Streptococcus*, *Fusobacterium*, and *Pseudomonas*. Em outro estudo anterior de Zhang *et al* (2010), *P. endodontalis*, *Actinomyces viscosus*, *Candida albicans*, e *Porphyromonas gingivalis*. Todos os estudos encontraram espécies muito semelhantes.

A carga microbiana é desconhecida para cada caso. Em alguns, há incidência clínica e radiográfica de cura quando a obturação termina a 1,5-2,0 mm aquém do ápice radiográfico, mantendo-se a vitalidade do coto periodontal (RICUCCI & LANGELAND, 1998), em outros casos, há bactérias nas ramificações apicais (NAIR *et al.* 1990, 1999, 2004; SIMON, 1994) que podem estar associadas a lesão periapical. O preparo de canais radiculares até o forame em canais infectados (SIMON, 1994; WEST & ROANE, 1998;

BUCHANAN, 2000) ou o uso do conceito de patencia (CAILLETAU & MULLANEY, 1997) podem limpar a maior parte da porção apical do canal radicular, mas bactérias podem sobreviver em canais acessórios e laterais e demais ramificações que permanecerão sem instrumentação adequada e sem influencia de irrigantes. Além disso, o preparo do canal radicular até o seu termino não significa eliminação completa da infecção radicular. Ao mesmo tempo, a patencia pode aumentar o risco de extrusão de debris contaminados, tecido pulpar, bactérias, materiais obturadores, soluções irrigadoras, todos associados a persistencia de periodontite apical (BYSTROM, *et al.* 1987; HOLLAND, 1992; LEONARDO, *et al.* 1997; RICUCCI & LANGELAND, 1998; MOLVEN, *et al.* 2002). Assim, não há evidencias científicas de que o conceito de preparo até forame ou o conceito de patencia irão contribuir para a cura. O mais efetivo para a cura é a cirurgia concomitante ao tratamento. Assim como uma irrigação ultrassonica durante o preparo do canal parece ser efetiva em areas não alcançadas por instrumentos e irrigação manual. A

A principal consideração no que se refere ao tratamento do biofilme perirradicular é que o clinico não pode detecta-lo em nenhum caso. Teoricamente isso quer dizer que um caso clinico resistente a terapia pode exigir uma amostra biológica que ira informar ao clinico se o canal radicular esta livre de bactérias ou não. Uma vez que a amostra resultou em cultura negativa o canal é obturado. Se a cura não ocorrer suspeita-se então de infecção extrarraducular. Entretanto deve ser enfatizado que microorganismos podem estar presentes no interior no canal radicular e escaparem da detecção das amostras coletadas. Isto é particularmente real nos casos de retratamento onde é difícil carrear amostras.

3.5 O papel da MIC.

O Hidroxido de Calcio tem sido incluído como componente de inumeros materiais e formulações antimicrobianas que são usadas em diversas modalidades dentro da endodontia. Isso inclui, como medicação intracanal entre sessões, capeamento pulpar direto, cimento obturador, dentre outros. Formulações a base de hidroxido de calcio são também usadas no tratamento de perfurações, fratura e reabsorções radiculares, tendo amplo uso dentro da traumatologia. A pasta pura de hidroxido de calcio tem um alto PH de aproximadamente 12,5-12,8 e é classificada quimicamente como uma forte base. Suas propriedades são alcançadas através da dissociação ionica de ions calcio e ions hidroxila nos tecidos vitais, induzindo a uma deposição de tecido mineralizado com propriedades

antibacterianas. O efeito letal do hidróxido de cálcio sob as bactérias é em decorrência da desnaturação proteica, dano ao DNA e a membrana citoplasmática. O hidróxido de cálcio tem uma ampla ação sobre os patógenos endodônticos mais comuns. É preciso um período de tempo maior para que ocorra a dissociação iônica, antes que o hidróxido de cálcio comece a se solubilizar quando em contato com tecidos vitais e fluidos. O hidróxido de cálcio é também efetivo contra endotoxinas, porém, seus efeitos sobre o biofilme bacteriano ainda é controverso.

O Hidróxido de Cálcio tem sido recomendado para uso como medicação intracanal baseado em sua alta alcalinidade, propriedade de dissolução tecidual e efeito antimicrobiano em bactérias gram + e gram -. O Hidróxido de Cálcio apresenta o poder de inativar a toxicidade da endotoxina quando usado como medicação intracanal por um período mínimo de 7 dias. (SAFAVI & NICHOLS, 1993; OLIVEIRA *et al.*, 2005). O Hidróxido de Cálcio altera algumas propriedades biológicas do LPS (SAFAVI & NICHOLS, 1993 e 1994; BARTHEL *et al.*, 1997; NELSON-FILHO *et al.*, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2005), tais como a habilidade em estimular prostaglandinas e fatores de necrose tumoral por monocitos e anticorpos (SAFAVI & NICHOLS, 1994; BARTHEL *et al.*, 1997; OLIVEIRA *et al.*, 2005). Estudos *in vivo* mostraram que Hidróxido de Cálcio como medicação intracanal por 30 ou 60 dias inativou o LPS, neutralizando seus efeitos em tecido periapical de cães (NELSON-FILHO *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2002; TANOMARU *et al.*, 2003).

Safavi e Nichols (1993 e 1994) relataram que o Hidróxido de Cálcio como medicação intracanal eleva a quantidade de ácidos graxos hidrolisados de ligações ésteres da molécula de lipídeo do lipopolissacarídeo. Este resultado sugere inativação pelo hidróxido de cálcio. A produção de prostaglandinas foi inibida em cultura de monocitos quando o LPS fora tratado com medicação de hidróxido de cálcio. Esses experimentos sugerem que as propriedades biológicas do LPS requerem a presença de ligações ésteres de ácidos graxos e que essas ligações são destruídas pelo hidróxido de cálcio.

Tem sido proposto que o efeito terapêutico do hidróxido de cálcio pode resultar em inativação direta do LPS. Barthel *et al.*, (1997) investigara se o potencial tóxico do LPS da *E coli* pode ser reduzido ou eliminado pelo hidróxido de cálcio, o que se comprova, pelo fato de eliminar a habilidade do LPS em estimular a produção de fator de necrose tumoral pelos monocitos em cultura.

Para OLIVEIRA *et al* (2005) o hidróxido de cálcio foi capaz de alterar a habilidade da endotoxina em estimular produção de anticorpos pelos B-linfócitos em cultura. O

Hidróxido de Cálcio é capaz de inativar a endotoxina sendo medicação intracanal por 7 dias. A polimicina B também foi efetiva contra o LPS do sistema de canis radiculares, o que está de acordo com outros estudos (RIFKIND et al., 1967; PARVIAINEN et al., 2001) que usaram a polimicina B no tratamento de septicemia e choque, causados por bactérias gram -. O poder de neutralização da polimicina B sobre o LPS foi observado pela primeira vez por NETER (1956). Rifkind & Palmer (1966), Morrison & Jacobs (1976) postularam um mecanismo de ação da polimicina B, um antibiótico catiónico, com ligações covalentes contra a molécula de lipídeo A que é carregada negativamente. As duas moléculas se unem fortemente por afinidade, alterando a conformação tridimensional do lipídeo A. Essa nova molécula grande e unida de polimicina B e Lipídeo A do LPS proporciona um tropismo à ligação com o receptor CD 14 dos monocitos, inibindo a liberação de mediadores inflamatórios como fator de necrose tumoral.

A endotoxina pode provocar dor em decorrência da ativação do fator de Hageman (SELTZER & FARBER, 1994) ou por propriedades neurotóxicas.

3.6 A ação do Ca(OH)_2 sobre o LPS.

O Hidróxido de Cálcio e a Polimixina B alteram as propriedades biológicas do LPS durante a ativação de resposta imune pelos anticorpos.

Safavi and Nichols (1994) avaliaram o efeito do Hidróxido de Cálcio na endotoxina da *Salmonella typhimurium* in vitro e concluíram que o Hidróxido de Cálcio hidrolisa a porção mais tóxica da molécula de lipídeo A . Em outro estudo de 1993 sobre a endotoxina da *Prevotella intermedia*, os pesquisadores encontraram que o Hidróxido de Cálcio transformou o lipídeo A em ácido graxo e aminoácidos que eram atóxicos. Essa informação sugere que as propriedades biológicas do LPS estão presas a cadeia de ácidos graxos ligados entre si por ésteres. A ação do hidróxido de cálcio descrita pode ser um dos mecanismos de inativação da molécula. Uma outra ação descrita é que o Hidróxido de Cálcio inativa o LPS por estimular a produção policlonal de anticorpos pelos B linfócitos (glóbulos brancos com receptores BCR – B Cell Receptor) específicos para se ligarem a determinados antígenos, produzindo anticorpos. Além da quebra de cadeia do lipídeo A pelo Hidróxido de Cálcio, o LPS pode se ligar a componentes mineralizados do osso. É possível que o Hidróxido de Cálcio possa se ligar a molécula de LPS ligada ao osso, e esta ser lavada para fora do canal radicular. Ou seja, um sequestro físico não pode ser descartado.

Barthel *et al.* (1997) investigaram o efeito do Hidroxido de Calcio sobre potencial toxico da *E. Coli* e constataram que o Hidroxido de Calcio é capaz de eliminar a habilidade do LPS em estimular o fator de necrose tumoral nos monocitos.

Buck *et al.* (2001) relataram que, ao longo tempo, o uso de medicação intracanal a base de hidroxido de calcio assim como 30 minutos de exposição a uma mistura alcalina de clorexidina, etanol, hipocloritode sodio inativou a molecula de LPS pela hidrolise das ligações esterres em acidos graxos da molecula de lipideo A.

Em estudos *in vivo*, Nelson-Filho *et al.* (2002) assim como Silva *et al.* (2002) avaliaram radiograficamente o efeito da endotoxina em contato com Hidroxido de Calcio em tecidos apicais e periapicais de dentes de caes e descobriram que o LPS causou o aparecimento de lesões periapicais em 30 dias e que o Hidroxido de Calcio inativou o LPS.

Tanomaru *et al.*, (2003) avaliaram o preparo biomecanico usando diferentes soluções irrigadoras e Hidroxido de Calcio como medicação intracanal em dentes de cães contendo a endotoxina. Resultados mostraram que o preparo biomecanico somente com soluções irrigadoras não inativou a endotoxina, mas que ao se associar a medicação intracanal de Hidroxido de Calcio, houve sucesso na inativação dos efeitos toxicos da endotoxina.

Jiang *et al.* 2003 tambem avaliou os efeitos diretos do LPS na osteoclastogenese e na capacidade de o Hidroxido de Calcio inibir a formação de osteoclastos estimulados pela endotoxina. Descobriram que o Hidroxido de Calcio reduziu significativamente a diferenciação de osteoclastos.

O LPS adere irreversivelmente a tecido mineralizado (BARTHEL *et al.*, 1997) tornando dificil sua remoção da parede dentinaria. O uso de substancia quelante antes da medicação intracanal de Hidroido de Calcio pode ajudar a remover o LPS das paredes. Mas isso tambem requer maiores investigações.

O mecanismo de inativação do LPS é atraves da alcali-hidrolise das ligações esterres dentro da molecula de lipideo A do LPS. (NIWA *et al.*, 1969). A estrutura de lipideo A consiste em muitas ligações esterres entre acidos graxos e cadeias de carboidratos. Cada um desses espaços pode sofrer hidrolise em presença de meio alcalino. Uma minima variação na cadeia de lipideo A rende uma estrutura biologica diferente e inativa! Logo, uma pequena mudança na cadeia lipidica pode inativar a endotoxina. O Hidroxido de Calcio é efetivo contra a endotoxina.

O hidroxido de calcio é o mais recomendado para neutralizar a endotoxina

(OLIVEIRA *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2004; TANOMARU *et al.*, 2003) e debris organicos remanescentes (HASSELGREN *et al.*, 1988).

Atualmente, a preocupação do endodontista é o tratamento de dentes com polpa necrosada e periodontite apical pois a doença ainda persiste após a conclusão do tratamento mais frequentemente quando comparados aos casos onde não há doença periapical. Em dentes com lesão periapical crônica, há uma grande prevalência de bactérias gram – anaeróbias espalhadas através do sistema de canais radiculares (tubulos dentinarios, defeitos e reabsorções apicais, falhas no cimento), incluindo a presença de biofilme bacteriano já formado. Devido ao fato dessas áreas não serem alcançadas pelos instrumentos durante o preparo, o uso de uma medicação intracanal se faz necessária para neutralização e eliminação dessas bactérias, aumentando o potencial para o sucesso. Logo, os procedimentos e medicamentos utilizados na terapia endodôntica não devem somente mirar a morte bacteriana mas também a inativação da endotoxina bacteriana.

Em resumo, a endotoxina, componente da parede celular de bactéria gram – desempenha um papel fundamental na gênese e na manutenção de lesões periapicais devido a indução de reação inflamatória e reabsorção óssea. Uma recente preocupação é relatada quanto ao uso do hidróxido de cálcio como medicação intracanal e o acompanhamento desse tratamento através de radiografias pois acompanhamento de periodontite apical com reabsorção óssea pode não ser visível em exames radiográficos convencionais, já que depende da densidade e espessura da camada de osso cortical e da distância entre a lesão e osso. Quando a lesão óssea estiver restrita a osso esponjoso e a camada de osso cortical for mais espessa, a lesão pode não ser vista na radiografia (Stabholz *et al.* 1994, Ricucci & Bergenholtz 2003). Entretanto, o acompanhamento de lesão periapical após o tratamento endodôntico pode ser radiograficamente comparado. Clinicamente foi relatado que uma lesão com mais de 8mm de diâmetro pode estar presente sem apresentar radiolucidez no filme. (Wu *et al.* 2006). Assim, a ausência de radiolucidez pode não mostrar ausência de bactéria residual e cura da doença.

Hidróxido de Cálcio tem sido amplamente utilizado como medicação intracanal devido sua capacidade de induzir a mineralização, atividade antimicrobiana e ação efetiva contra o lipopolissacarídeo (VALERA *et al.*, 2010). Alguns autores também evidenciam ação de hidrólise na porção lipídica da endotoxina, liberando grande quantidade de ácidos graxos, neutralizando seus efeitos biológicos (SAFAVI & NICHOLS, 1994). A mistura de Hidróxido de Cálcio e clorexidina gel 2% tem sido usada satisfatoriamente como

medicação intracanal, mostrando ação antimicrobiana, reparo e atividade efetiva contra a endotoxina presente no sistema de canais radiculares (GOMES et al., 2002 e 2003). A polimicina B também tem resultados positivos, bloqueando os efeitos biológicos causados pela endotoxina (MORRISON et al., 1976; OLIVEIRA et al., 2007).

4. CONCLUSÕES.

Calcados na revista da literatura, nos parece lícito concluir que:

1. Bacterias gram – desempenham um papel essencial nas infecções endodonticas primarias.
2. O LPS é um dos mais importantes fatores de virulencia bacterianos, desempenhando um papel fundamental na iniciação, desenvolvimento e manutenção da inflamação periapical.
3. Endotoxina é liberada por bacterias gram – e tem sido detectada em casos de infecção primaria de canais radiculares. Grande quantidade de endotoxina tem sido identificada como responsavel por dor espontanea, sensibilidade a palpação e a percussão. Devido a alta toxicidade da endotoxina, foi detectado inflamação periapical, reabsorção de osso alveolar e estimulação de citocinas (mediadores inflamatorios que encabeçam destruição tecidual).
4. O receptor TLR-4 está envolvido na ativação de celulas do sistema imune do hospedeiro, quando este estiver em contato com o LPS.
5. A profundidade de alcance de bacterias gram – é de no maximo 250 um, enquanto que a capacidade de alcance do LPS chega a 800 ug, representando aproximadamente um alcance 4 vezes maior que uma invasão bacteriana. Isso se deve ao peso molecular do lipopolissacarideo, muito baixo. Assim, o alargamento apical do canal radicular finalizado em 3 instrumentos maiores que o diametro anatomico pode deixar para tras mais de 50% de dentina infectada! Um alargamento maior que 500 um pode se fazer necessario para remoção optimizada da maior quantidade de endotoxina possível. Entretanto essa manobra pode não ser compativel com a maioria dos casos, em decorrência da limitação de alargamento (grau de curvatura, diametro da curvatura e espessura mesio distal das raizes).
6. Para alcançar o máximo de desinfecção do sistema de canais radiculares, o tratamento endodontico não deve somente eliminar bacterias e substratos, mas deve também inativar o LPS! Devido a alta toxicidade da endotoxina, uma atenção especial tem sido dada para se obter uma substancia que a inactive, eliminando assim seu potencial biologicamente toxico. Dentre os medicamentos estudados, o Hidróxido de cálcio parece suprimir diretamente os efeitos

biologicos do LPS.

5. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA.

- ABBOTT, P. V. **The periapical space--a dynamic interface.** Aust Endod J., v. 28, n. 3, p. 96-107, 2002.
- ALEXANDER, H. R.; DOHERTY, G. M.; BURE, S. H.C. M.; VBKZOND, J.; NORTON, J. A. **A recombinant human receptor antagonist to interleukin 1 improves survival after lethal endotoxemia in mice.** Journal of Experimental Medicine, v. 173, p. 1029-32, 1991.
- BAIK, J. E.; JANG, K. S.; KANG, S. S.; YUN, C. H.; LEE, K.; KIM, B. G.; KUM, K. Y. HAN, S. H. **Calcium hydroxide inactivates lipoteichoic acid from Enterococcus faecalis through deacylation of the lipid moiety.** J Endod., v. 37, n. 2, p. 191-6, 2011.
- BARTHEL, C. R.; LEVIN, L. G.; REISNER, H. M.; TROPE, M. **TNF-alpha release in monocytes after exposure to calcium hydroxide treated Escherichia coli LPS.** Int Endod J., v. 30, n. 3, p. 55-9, 1997.
- BAUM, T. D.; HBAR, S. O.; FELDHAN, H. S.; LATKA, C. A.; FINK, M. P. **Endotoxin-induced myocardial depression in rats: effect of ibuprofen and SDZ 64-688 a platelet activating factor receptor antagonist.** Journal of Surgical Research, v. 48, p. 629-34, 1991.
- BENGOECHEA, J. A.; NAJDENSKI, H.; SKURNIK, M. **Lipopolysaccharide O antigen status of Yersinia enterocolitica O:8 is essential for virulence and absence of O antigen affects the expression of other Yersinia virulence factors.** Mol Microbiol., v. 52, p. 451-469, 2004.
- BERKITTEN, M.; OKAR, I.; BERKITTEN, R. **In vitro study of the penetration of Streptococcus sanguis and Prevotella intermedia strains into human dentinal tubules.** J Endod., v. 26, p. 236-9, 2000.

BOTERO, T. M.; SON, J. S.; VODOPYANOV, D.; HASEGAWA, M.; SHELBURNE, C. E.; NOR, J. E. **MAPK Signaling Is Required for LPS-induced VEGF in Pulp Stem Cells.** J Dent Res., v. 89, n. 3, p. 264-269, 2010.

BUCK, R. A.; CAI, J.; ELEAZER, P. D.; STAAT, R. H.; HURST, H. E. **Detoxification of endotoxin by endodontic irrigants and calcium hydroxide.** J Endod., v. 27, n. 5, p. 325-7, 2001.

BULIERIS, P.V.; BEHRENS, S.; HOLST, O.; KLEINSCHMIDT, J.H. **Folding and insertion of the outer membrane protein OmpA is assisted by the chaperone Skp and by lipopolysaccharide.** J Biol Chem., v. 278. p. 9092–9099, 2003.

BUTTLER, T. K.; CRAWFORD, J. J. **The detoxifying effect of varying concentrations of sodium hypochlorite on endotoxins.** J Endod., v. 8, p. 59-66, 1982.

BYSTROM, A.; SUNDQVIST, G. **Bacteriologic evaluation of the effect of 0.5 percent sodium hypochlorite in endodontic therapy.** Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology., v. 55, p. 307-12, 1983.

CAHILL, C. M; DRAY, A; CODERRE, T. J. **Priming enhances endotoxin-induced thermal hyperalgesia and mechanical allodynia in rats.** Brain Res., v. 12, p. 13-22, 1998.

CHOKECHANACHAISAKUL, U.; KANEKO, T.; YAMANAKA, Y.; KANEKO, R.; KATSUBE, K.; KOBAYASHI, H.; NOR, J. E.; OKIJI, T.; SUDA, H. **Gene expression analysis of resident macrophages in lipopolysaccharide-stimulated rat molar pulps.** J Endod., v. 37, n. 9, p. 1258-63, 2011.

COHN, S. M.; FINK, M. P.; LEE, P. C.; WANG, H.; ROTHSCHILD, H. R.; DENIZ, Y. F.; BAUM, T. **LY 171883 preserves mesenteric perfusion in porcine endotoxin shock.** Journal of Surgical Research, v. 49. p. 37-40, 1990.

COON, D.; GULATI, A.; COWAN, C.; HE, J. **The role of cyclooxygenase-2 (COX-2) in inflammatory bone resorption.** J Endod., v. 33, n. 4, p. 432-6, 2007.

CREASEY, A. A.; STEVENS, F.; KENNEY, J.; ALLISON, A. C.; WARREN, K.; CATLETT R.; HINSHAW, L.; TAYLORE, F. B. JR. **Endotoxin and cytokine profile in plasma of baboons challenged with lethal and sublethal *Escherichia coli* Circulatory shock.** Journal of Surgical Research, v. 33, p. 84-91, 1991.

DAHLEN, G.; BERGENHOLTZ, G.; **Endotoxic activity in teeth with necrotic pulps.** J Dent Res., v. 59, p. 1033-40, 1980.

DAHLEN, G.; MAGNUSSON, B. C.; MOLLER, A. **Histological and histochemical study of the influence of lipopolysaccharide extracted from *Fusobacterium nucleatum* on the periapical tissues in the monkey *Macaca fascicularis*.** Archs Oral Biol., v. 26, p. 591-598, 1981.

DA SILVA, L. A.; DA SILVA, R. A.; BRANCO, L. G.; NAVARRO, V. P.; NELSON-FILHO, P. **Quantitative radiographic evaluation of periapical bone resorption in dog's teeth contaminated with bacterial endotoxin (LPS) associated or not with calcium hydroxide.** Braz Dent J., v. 19, n. 4, p. 296-300, 2008.

DELAISSE, J. M.; EECKHOUT, Y; NEFF, L.; **Procollagenase (matrix metalloproteinase 1) is present in rodent osteoclasts and in the underlying bone resorbing compartment.** J Cell Sci.; v. 106, p. 1071-82, 1993.

DE OLIVEIRA, L. D.; JORGE, A.O.; CARVALHO, C. A.; KOGA-ITO, C. Y.; VALERA, M. C. **In vitro effects of endodontic irrigants on endotoxins in root canals.** Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod., v. 104, n. 1, p. 135-42, 2007.

DEWHIRST, F. E. **N-acetyl muramyl dipeptide stimulation of bone resorption in tissue culture.** Infect Immun., v. 35, p. 133-137, 1982.

DIOGENES, A.; FERRAZ, C. C.; AKOPIAN, A. N.; HENRY, M. A.; HARGREAVES, K. M. **LPS sensitizes TRPV1 via activation of TLR4 in trigeminal sensory neurons.** J Dent Res., v. 90, n. 6, p. 759-64, 2011.

DUERDEN, B. I. **Virulence factors in anaerobes.** Clin Infect Dis., v. 18, p. 253-9, 1994.

DWYER, T. G.; TORABINEJAD, M. **Radiographic and histologic evaluation of the effect of endotoxin on the periapical tissues of the cat.** J Endod., v. 7, n. 1, p. 31-5, 1981.

FARBER, P. A.; SELTZER, S. **Endodontic microbiology. I. Etiology.** Journal of Endodontics, v. 14, n. 7, p. 363-71, 1988.

FERRAZ, C. C.; HENRY, M. A.; HARGREAVES, K. M.; DIOGENES, A. **Lipopolysaccharide from Porphyromonas gingivalis sensitizes capsaicin-sensitive nociceptors.** J Endod., v. 37, n. 1, p. 45-8, 2011.

FULLER, K.; CHAMBERS, T, J. **Localisation os RNAm for collagenase in osteocytic, bone surface and chondrocytic cells but not osteoclasts.** J Cell Sci., v. 108, p. 2221-30, 1995.

GOMES, B. P; PINHEIRO, E. T; GADE-NETO, C. R. **Microbiological examination of infected dental root canals.** Oral Microbiol Immunol., v. 19, p. 71-76, 2004.

GOMES, B. P.; VIANNA, M. E.; SENA, N. T.; ZAIA, A. A.; FERRAZ, C. C. R.; SOUZA-FILHO, F. J. **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., v. 102, p. 544-50, 2006.

GOMES, B. P.; MARTINHO, F. C.; VIANNA, M.E. **Comparison of 2.5% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine gel on oral bacterial lipopolysaccharide reduction from primarily infected root canals.** J Endod., v. 35, n. 10, p. 1350-3, 2009.

GOMES, B. P.; ENDO, M. S.; MARTINHO, F. C. **Comparison of endotoxin levels found in primary and secondary endodontic infections.** J Endod., v. 38, n. 8, p. 1082-6, 2012.

HAAPASALO, M; QIAM, W;; PORTENIER, I; WALTIMO, T. **Effects of dentin on the antimicrobial properties of endodontic medicaments.** J Endod., v. 33, p. 917-25, 2007.

HASSELGREN, G.; OLSSON, B.; CVEK, M. **Effects of calcium hydroxide and sodium hypochlorite on the dissolution of necrotic porcine muscle tissue.** J Endod., v. 14, p. 125-127, 1988.

HAUSMANN, E.; WEINFELD, N.; MILLER, W. A. **Effects of lipopolysaccharides on bone resorption in tissue culture.** Calcif Tissue Res., v. 9, p. 272-282, 1972.

HAUSMANN, E; LUDERITZ, O; KNOX, K; WEINFELD. N. **Structural requirements for bone resorption by endotoxin and lipoteichoic acid.** J Dent Res., v. 54, p. BP4-BPP, 1975.

HAPPONEN, R. P. **Periapical actinomycosis: a follow-up study of 16 surgically treated cases.** Endod Dent Traumatol., v. 2, p. 205-209, 1986.

HENDERSON, B,; WILSON, M. **Modulins: a new class of cytokine inducing pro inflammatory bacterial virulence factor.** Inflamm Res., v. 44, p. 187-97, 1995.

HENDERSON, B.; WILSON, M. **Cytokine induction by bacteria: beyond lipopolysaccharide.** Cytokine. v. 8, p. 269-82, 1996.

HONG,C. Y.; LIN, S. K.; KOK, S. H.; CHENG, S. J.; LEE, M. S.; WANG, T. M.; CHEN, C. S.; LIN, L. D.; WANG, J. S. **The role of lipopolysaccharide in infectious bone resorption of periapical lesion.** J Oral Pathol Med., v. 33, n. 3, p. 162-9, 2004.

HORIBA, N; MAEKAWA, Y; ABE, Y; ITO, M; MATSUMOTO, T; NAKAMURA, H. **Correlations between endotoxin and clinical symptoms or radiolucent areas in infected root canals.** Oral Surg Oral Med Oral Pathol., v. 71, p. 492-5, 1991.

HOSOYA, S.; MATSUSHIMA, K. **Stimulation of interleukin-1 beta production of human dental pulp cells by Porphyromonas endodontalis lipopolysaccharide.** J Endod., v. 23, n. 1, p. 39-42, 1997.

HUCK, O.; ELKAIM, R.; DAVIDEAU, J. L.; TENEMBAUM, H. **Porphyromonas gingivalis and its lipopolysaccharide differentially regulate the expression of cathepsin B in endothelial cells.** Mol Oral Microbiol., v. 27, n. 3, p. 137-48, 2012.

IREDELL, J. R.; STROEHER, U. H.; WARD, H. M.; Manning, P. A. **Lipopolysaccharide O-antigen expression and the effect of its absence on virulence in rfb mutants of Vibrio cholerae.** Immunol Med Microbiol., v. 20, p. 45–54, 1998.

JACINTO, R. C; GOMES, B. P; FERRAZ, C. C; ZAIA, A. A; FILHO, F. J. **Microbiological analysis of infected root canals from symptomatic and asymptomatic teeth with periapical periodontitis and the antimicrobial susceptibility of some isolated anaerobic bacteria.** Oral Microbiol Immunol., v. 18, p. 285-292, 2003.

JACINTO, R. C.; GOMES, B. P. F. A.; SHAH, H. N.; FERRAZ, C. C.; ZAIA, A. A, SOUZA-FILHO, F. J. **Quantification of endotoxins in necrotic root canals from symptomatic and asymptomatic teeth.** J Med Microbiol., v. 54, p. 777-83, 2005.

JAIN, S.; VAN ULSEN, P.; Benz, I. **Polar localization of the autotransporter family of large bacterial virulence proteins.** J Bacteriol., v. 188, p. 4841–4850, 2006.

JAIN, S.; DARVEAU, R. P. **Contribution of Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide to periodontitis.** Periodontol 2000., v. 54, n. 1, p. 53-70, 2010.

JENKIN, J. K.; CAREY, P. D.; BYRME, K.; SUGERMAN, H. J.; FOWLER, A. **Sepsis-induced lung injury and the effects of ibuprofen pretreatment. Analysis of early alveolar events vs repetitive bronchoalveolar lavage.** American Reviews of Respiratory Diseases, v. 143, p.155-61, 1991.

JIANG, J.; ZUO, J.; CHEN, S. H.; HOLLIDAY, L. S. **Calcium hydroxide reduces lipopolysaccharide-stimulated osteoclast formation.** Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod., v. 95, n. 3, p. 348-54, 2003.

JIANG, H. W.; ZHANG, W.; REN, B. P.; ZENG, J. F.; LING, J. Q. **Expression of toll like receptor 4 in normal human odontoblasts and dental pulp tissue.** J Endod., v. 32, p. 747-51, 2006,

KAKEHASHI, S.; STANLEY, H. R.; FITZGERALD, R. J. **Effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats.** Oral Surg Oral Med Oral Pathol., v. 20, p. 340-9, 1965.

KEBSCHULL, M.; PAPAPANOU, P. N. **Periodontal microbial complexes associated with specific cell and tissue responses.** J Clin Periodontol., v. 38, n. 11, p. 17-27, 2011.

KHABBAZ, M. G.; ANASTASIADIS, P. L.; SYKARAS, S. N. **Determination of endotoxins in caries: association with pulpal pain.** Int Endod J., v. 33, n. 2, p. 132-7, 2000.

KHABBAZ, M. G.; ANASTASIADIS, P. L.; SYKARAS, S. N. **Determination of endotoxins in the vital pulpl of human carious teeth: association with pulpal pain.** Oral Surg Oral Med Oral Pathol, v. 91, n. 5, p. 587-93, 2001.

LAGHIOS, C. D.; CUTLER, C. W.; GUTMANN, J. L. **In vitro evidence that lipopolysaccharide of an oral pathogen leaks from root-end filled teeth.** Int Endod J., v. 33, n. 4, p. 333-9, 2000.

LEAN, J. M.; MURPHY, C.; FULLER, K.; CHAMBERS, T. J. **CCL9/MIP-1 γ and its receptor CCR1 are the major chemokine ligand/receptor species expressed by osteoclasts.** J Cell Biochem., v. 87, p. 386-393, 2002.

LEE, S. H.; BAEK, D. H. **Antibacterial and neutralizing effect of human β -defensins on Enterococcus faecalis and Enterococcus faecalis lipoteichoic acid.** J Endod., v. 38, n. 3, p. 351-6, 2012.

LEONARDO, M. R.; ROSSI, M. A.; SILVA, L. A.; ITO, I. Y.; BONIFACIO, K.C. **EM evaluation of bacterial biofilm and microorganisms on the apical external root surface of human teeth.** J Endod., v. 28, p. 815–8, 2002.

LIN, L. M.; PASCON, E. A.; SKRIBNER, J.; GANGLER, P.; LANGELAND, K. **Clinical, radiographic, and histologic study of endodontic treatment failures.** Oral Surg Oral Med Oral Pathol., v. 71, p. 603-11, 1991.

LIN, L. M.; RICUCCI, D.; LIN, J.; ROSENBERG, P. A. **Nonsurgical root canal therapy of large cyst-like inflammatory periapical lesions and inflammatory apical cysts.** J Endod., v. 35, n. 5, p. 607-15, 2009.

LIN, S, K.; CHIANG, C. P.; HONG, C. Y. **Immunolocalization of interstitial collagenase (MMP1) and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 (TIMP 1) in radicular cysts.** J Oral Pathol Med., v. 26, p. 458-63, 1997.

LIN, S, K.; KOK, S, H.; KUO, M. Y. **Sequential expressions os MMP1, TIMP1, IL6 e COX2 genes in induced periapical lesions in rats.** Eur J Oral Sci., v. 110, p. 246-53, 2002.

LIU, B.; CHENG, L.; LIU, D.; WANG, J.; ZHANG, X.; SHU, R.; LIANG, J. **Role of p38 mitogen-activated protein kinase pathway in Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide-induced VCAM-1 expression in human aortic endothelial cells.** J Periodontol., v. 83, n. 7, p. 955-62, 2012.

MAGNUSON, D. K.; WEINTRAUB, A.; POHLMAN, T. H.; MAIER, R. V. **Human endothelial cell adhesiveness for neutrophils, induced by Escherichia coli lipopolysaccharide in vitro is inhibited by Bacterioides fragilis lipopolysaccharide.** J Immunol., v. 143, p. 3025-30, 1989.

MARINHO, A. C.; MARTINHO, F. C.; ZAIA, A. A.; FERRAZ, C. C.; GOMES, B. P. **Influence of the apical enlargement size on the endotoxin level reduction of dental root canals.** J Appl Oral Sci., v. 20, n. 6, p. 661-6, 2012.

- MARTINHO, F. C.; CHIESA, W. M.; LEITE, F. R.; CIRELLI, J. A.; GOMES, B. P. **Correlation between clinical/radiographic features and inflammatory cytokine networks produced by macrophages stimulated with endodontic content.** J Endod., v. 38, n. 6, p. 740-5, 2012.
- MARTINHO, F. C.; CHIESA, W. M.; ZAIA, A. A.; FERRAZ, C. C.; ALMEIDA, J. F.; SOUZAFILHO, F. J.; GOMES, B. P. **Comparison of endotoxin levels in previous studies on primary endodontic infections.** J Endod., v. 37, n. 2, p. 163-7, 2011.
- MARTINHO, F. C.; GOMES, B. P. **Quantification of endotoxins and cultivable bacteria in root canal infection before and after chemomechanical preparation with 2.5% sodium hypochlorite.** J Endod., v. 34, n. 3, p. 268-72, 2008.
- MARTON, I. J.; KISS, C. **Protective and destructive immune reactions in apical periodontitis.** Oral Microbiol Immunol., v. 15, n. 3, p. 139-50, 2000.
- MATSUSHITA, K.; TAJIMA, T.; TOMITA, K.; TAKADA, H.; NAGAOKA, S.; TORII, M. **Inflammatory cytokine production and specific antibody responses to lipopolysaccharide from endodontopathic black-pigmented bacteria in patients with multilesional periapical periodontitis.** J Endod., v. 25, p. 795-9, 1999.
- MATTISON, G. D.; HADDIX, J. E.; KEHOE, J. C.; PROGULSKE-FOX, A. **The effect of *Eikenella corrodens* endotoxin on periapical bone.** J endod., v. 13, p. 559-565, 1987.
- MIYAKE, K. **Roles for accessory molecules in microbial recognition by Toll-like receptors.** J Endotoxin Res., v. 2, p. 195–204, 2006.
- MOHAMMADI, Z. **Endotoxin in endodontic infections: a review.** J Calif Dent Assoc., v. 39, n. 3, p.152-5, 158-61, 2011.
- MOHAMMADI, Z.; DUMMER, P. M. **Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology.** Int Endod J., v. 44, n. 8, p. 697-630, 2011.

MOLLER, A. J. R.; FABRICIUS, L.; DAHLEN, G.; OHMAN, A. E.; HEYDMAN, G. **Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys.** Scand J Dent Res., v. 89, p. 29-39, 1981.

MORRISON, D. C.; JACOBS, D. M. **Binding of polymyxin B to the lipid A portion of bacterial lipopolysaccharides.** Immunochemistry, v. 13, n. 10, p. 813-8, 1976.

MORSE, D. R. **Endodontic microbiology in the 1970s.** Int Endod J., v. 14, n. 2, p. 69-79, 1981.

MUTOH, N.; TANI-ISHII, N.; TSUKINOKI, N.; CHIEDA, K.; WATANABE, K. **Expression of toll-like receptor 2 and 4 in dental Pulp.** J Endod., v. 33, p. 1183-6, 2007.

NAIR, P. N. R.; SJOGREN, U.; KAHNBERG, K. E.; KREY, G.; SUNDQVIST, G. **Intraradicular bacteria and fungi in root-filled, asymptomatic human teeth with therapy-resistant periapical lesions: a long-term light and electron microscopic follow-up study.** J Endod., v. 16, p. 580-8, 1990.

NAIR, P. N. R.; MEGHJI, S.; WILSON, M.; REDDI, K.; WHITE, P.; HENDERSON, B. **Bacterially induced bone destruction: mechanisms and misconceptions.** Infect Immun., v. 64, p. 2371-2380, 1996.

NAIR, P. N. R. **Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures.** Crit Rev Oral Med., v. 15, p. 348-81, 2004.

NAIR, P. N. R. **On the causes of persistent apical periodontitis: a review.** Int Endod J., v. 39, n. 4, p. 249-81, 2006.

NAKANE, A.; YOSHIDA, T.; NAKATA, K.; HORIBA, N.; NAKAMURA, H. **Effects of lipopolysaccharides on human dental pulp cells.** J Endod., v. 21, n. 3, p. 128-30, 1995.

NELSON-FILHO, P.; LEONARDO, M. R.; SILVA, L. A.; ASSED, S. **Radiographic evaluation of the effect of endotoxin (LPS) plus calcium hydroxide on apical and periapical tissues of dogs.** J Endod.; v. 28, n. 10, p. 694-6, 2002.

NETER, E. **Bacterial hemagglutination and hemolysis.** Bacteriological Reviews. v. 20, p. 166-88, 1956.

NISSAM, R.; SEGAL, H.; PASHLEY, D.; STEVENS, R.; TROWBRIDGE, H. **Ability of bacterial endotoxin to diffuse through human dentin.** Journal of Endodontics., v. 21, n. 2, p. 62-4, 1995.

NIWA, M; MILNER, K. C; RIBI, E; RUDBACH, J. A. **Alteration of physical, chemical and biological properties of endotoxin by treatment with mild alkali.** J Bacteriol., v. 97, p. 1069-77, 1969.

NOIRI, Y.; EHARA, A.; KAWAHARA, T.; TAKEMURA, N.; EBISU, S. **Participation of bacterial biofilms in refractory and chronic periapical periodontitis.** J Endod., v. 28, p. 679-83, 2002.

OGAWA, T.; YAGI, T. **Bioactive mechanism of Porphyromonas gingivalis lipid A.** Periodontol 2000., v. 54, n. 1, p. 71-7, 2010.

OHKURA, N.; SHIGETANI, Y.; YOSHIBA, N.; YOSHIBA, K.; OKIJI, T. **Gene expression analysis of membrane transport proteins in normal and lipopolysaccharide-inflamed rat dental pulp.** J Endod., v. 38, n. 5, p. 648-52, 2012.

OLIVEIRA, L. D.; CARVALHO, C. A. T.; KOGA-YTO, C. Y.; VALERA, M. C.; JORGE, A. O. C. **Avaliação in vitro da capacidade de difusão da endotoxina pelos tubulos dentinarios.** Pesquisa Odontologica Brasileira, v. 17, p. 173, 2003.

- OLIVEIRA, L. D.; CARVALHO, C. A.; CARVALHO, A. S.; ALVES JDE, S.; VALERA, M. C.; JORGE, A. O. **Efficacy of endodontic treatment for endotoxin reduction in primarily infected root canals and evaluation of cytotoxic effects.** J Endod., v. 38, n. 8, p. 1053-7, 2012.
- OLIVEIRA, L. D.; LEÃO, M. V.; CARVALHO, C. A.; CAMARGO, C. H.; VALERA, M. C. JORGE, A. O.; UNTERKIRSCHER, C. S. **In vitro effects of calcium hydroxide and polymyxin B on endotoxins in root canals.** J Dent., v. 33, n. 2, p. 107-14, 2005.
- PARVIAINEN, A. K.; BARTON, M. H.; NORTON, N. N. **Evaluation of polymyxin B in an ex vivo model of endotoxemia in horses.** American Journal of Veterinary Research, v. 62, n. 1, p. 72-6, 2001.
- PETSCH, D.; ANSPACH, F. B. **Endotoxin removal from protein solutions.** J Biotechnol., v. 76, n. 2-3, p. 97-119, 2000.
- PINHEIRO, E. T; GOMES, B. P; FERRAZ, C. C; SOUZA, E. L; TEIXEIRA, F B; SOUZA-FILHO, F. J. **Bacteria from canals of root-filled teeth with periapical lesions.** Int Endod J., v. 36, p. 1-11, 2003.
- PITTS, D. L.; WILLIAMS, B. L.; MORTON, Jr. T. H. **Investigation of role of endotoxin in periapical inflammation.** J Endod., v. 8, p. 10-8, 1982.
- RAETZ, C.R.; WHITFIELD, C. **Lipopolysaccharide endotoxins.** Annu Rev Biochem., v. 71, p. 635–700, 2002.
- RICUCCI, D.; SIQUEIRA, J. F. Jr. **Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings.** J Endod., v. 36, n. 8, p. 1277-88, 2010.
- RICUCCI, D.; SIQUEIRA, J. F. Jr. **Apical actinomycosis as a continuum of intraradicular and extraradicular infection: case report and critical review on its involvement with treatment failure.** J Endod., v. 34, n. 9, p. 1124-9, 2008.

RIETSCHER, E. T.; BRADE, H. **Bacterial endotoxins**. Sci Am., v. 267, p. 54-61, 1992.

RIFKIND, D. **Prevention by polymyxin B of endotoxin lethality in mice**. Journal of Bacteriology, v. 93, n. 4, p. 1463-4, 1967.

RIFKIND, D.; PALMER, J. D. **Neutralization of endotoxin toxicity in chick embryos by antibiotics**. Journal of Bacteriology, v. 92, n. 4, p. 815-9, 1966.

ROCAS, I. N.; SILQUEIRA, J. F. Jr.; ANDRADE, A. F. B.; UZEDA, M. **Identification of selected putative oral pathogens in primary root canal infections associated with symptoms**. Anaerobe, v. 8, p. 200-8, 2002.

ROCHA, C. T.; ROSSI, M. A.; LEONARDO, M. R.; ROCHA, L. B.; NELSON-FILHO, P.; SILVA, L. A. **Biofilm on the apical region of roots in primary teeth with vital and necrotic pulps with or without radiographically evident apical pathosis**. Int Endod J., v.41, n. 8, p. 664-9, 2008.

SAFAVI, K. E.; NICHOLS, F. C. **Effect of calcium hydroxide on bacterial lipopolysaccharide**. J Endod., v. 19, n. 2, p. 76-8, 1993.

SAFAVI, K. E.; NICHOLS, F. C. **Alteration of biological properties of bacterial lipopolysaccharide by calcium hydroxide treatment**. J Endod., v. 20, p. 127-129, 1994.

SANT'ANNA, A. T.; RAMALHO, L. T. O.; SPOLIDORIO, D. M. P. **Effect of the formocresol on bacterial LPS in mouse's subcutaneous tissue**. J Dent Res., v. 79, p. 1084, 2000.

SCHEIN, B.; SCHILDER, H. **Endotoxin content in endodontically involved teeth**. J Endod., v. 1, n. 1, p. 19-21, 1975.

SELTZER, S.; FARBER, P. A. **Microbiologic factors in endodontology**. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, v. 78, p. 634-45, 1994.

SEYMOUR, G. J.; GEMMEL, E. **Cytokines in periodontal disease: where to from here?** Acta Odontol Scand., v. 59, p. 167–73, 2001.

SHOENFELD, S. E.; GREENING, A. B.; GLICK, D. H.; FRANK, A. L.; SIMON, J. H.; HERLES, S. M. **Endotoxic activity in periapical lesions.** Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod., v. 53, p. 82-87, 1982.

SIGNORETTI, F. G.; ENDO, M. S.; GOMES, B. P.; MONTAGNER, F.; TOSELLO, F. B.; JACINTO, R. C. **Persistent extraradicular infection in root-filled asymptomatic human tooth: scanning electron microscopic analysis and microbial investigation after apical microsurgery.** J Endod., v. 37, n. 12, p. 1696-700, 2011.

SIGNORETTI, F. G.; GOMES, B. P.; MONTAGNER, F.; BARRICHELLO TOSELLO, F.; JACINTO, R. C. **Influence of 2% chlorhexidine gel on calcium hydroxide ionic dissociation and its ability of reducing endotoxin.** Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod., v. 111, n. 5, p. 653-8, 2011.

SILVA, L.; NELSON FILHO, P.; LEONARDO, M. R.; ROSSI, M. A.; PANSANI, C. A. **Effect of calcium hydroxide on bacterial endotoxin in vivo.** J Endod., v. 28, n. 2, p. 94-8, 2002.

SILVA, L. A.; LEONARDO, M. R.; ASSED, S.; TANOMARU-FILHO, M. **Histological study of the effect of some irrigating solutions on bacterial endotoxin in dogs.** Braz Dent J., v. 15, n. 2, p. 109-14, 2004.

SIQUEIRA, J. F. Jr; LOPES, H. P. **Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review.** Int Endod J., v. 32, p. 361-9, 1999.

SIQUEIRA, J. F. JR. **Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail.** Int Endod J., v. 34, n. 1, p. 1-10, 2001.

SJOGREN, U; HAPPONEN, R. P; KAHNBERG, K. E; SUNDQVIST, G. **Survival of Arachnia propionica in periapical tissue.** Int Endod J., v. 21, p. 277-282, 1988.

STANLEY, P.L.; DIAZ, P.; BAILEY, M.J.; GYGI, D.; JUAREZ, A.; HUGHES, C. **Loss of activity in the secreted form of Escherichia coli haemolysin caused by an rfaP lesion in core lipopolysaccharide assembly.** Mol Microbiol., v. 10, p. 781–787, 1993.

STASHENKO, P.; WANG, C. Y. **Characterization of bone resorptive mediators in active periapical lesions.** Poc Finn Dent Soc., v. 88, p. 427-32, 1992.

STRAATSMA, T. P.; SOARES, T. A. **Characterization of the outer membrane protein OprF of Pseudomonas aeruginosa in a lipopolysaccharide membrane by computer simulation.** Proteins., v. 74, p. 475–488, 2009.

SULLIVAN, J. D. Jr.; WATSON, S. W. **Purification and properties of the clotting enzyme from Limulus lysate.** Biochem Biophys Res Commun., v. 66, p. 848-55, 1975.

SUNDE, P. T.; OLSEN, I.; LIND, P. O.; TRONSTAD, L. **Extraradicular infection: a methodological study.** Endod Dent Traumatol., v. 16, n. 2, p. 84-90, 2000.

SUNDQVIST, G.; JOHANSSON, E.; SJOGREN, U. **Prevalence of black-pigmented bacteroides species in root canal infections.** J Endod., v.15, p. 13–9, 1989.

SUNDQVIST, G. **Associations between microbial species in dental root canal infections.** Oral Microbiol Immunol., v. 7, p. 257-62, 1992.

TACHIBANA, K.; HIROTA, S.; LIZASA, H.; YOSHIDA, H.; KAWABATA, K.; KATAOKA, Y. **The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract.** Nature, v. 393, p. 591-594, 1998.

TAMAI, R.; SUGAMATA, M.; KIYOURA, Y. **Amphotericin B up-regulates lipid A-induced IL-6 production via caspase-8.** J Dent Res., v. 91, n. 7, p. 709-14, 2012.

TANG, G.; KAWAI, T.; KOMATZUSAWA, H.; MINTZ, K. P. **Lipopolysaccharides mediate leukotoxin secretion in Aggregatibacter actinomycetemcomitans.** Mol Oral Microbiol., v. 27, n. 2, p. 70-82, 2012.

TANI-ISHII, N.; WANG, C. Y.; TANNER, A.; STASHENKO, P. **Changes in root canal microbiota during the development of rat periapical lesions.** Oral Microbiol Immunol., v. 9, n. 2, p. 129-35, 1994.

TANOMARU, J. M.; LEONARDO, M. R.; TANOMARU FILHO, M.; BONETTI FILHO, I.; SILVA, L. A. **Effect of different irrigation solutions and calcium hydroxide on bacterial LPS.** Int Endod J., v. 36, n. 11, p. 733-9, 2003.

TROMBETTA-E-SILVA, J.; YU, H.; ARIAS, D.N.; ROSSA, C JR.; KIRKWOOD, K. L.; BRADSHAW, A. D. **LPS induces greater bone and PDL loss in SPARC-null mice.** J Dent Res., v. 90, n. 4, p. 477-82, 2011.

UNEMORI, E. N.; EHSANI, N.; WANG, M.; LEE, S.; MCGUIRE, J.; AMENTO, E. P. **Interleukin 1 and transforming growth factor alpha: synergistic stimulation of metalloproteinases, PGE2, and proliferation in human fibroblasts.** Exp Cell Res., v. 210, p. 166-71, 1994.

VALERA, M. C.; DA ROSA, J. A.; MAEKAWA, L. E.; DE OLIVEIRA, L. D.; CARVALHO, C. A.; KOGA-ITO, C. Y.; JORGE, A. O. **Action of propolis and medications against Escherichia coli and endotoxin in root canals.** Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod., v. 110, n. 4, p. E70-4, 2010.

VIANNA, M. E.; HORZ, H. P.; CONRADS, G.; ZAIA, A. A.; SOUZA-FILHO, F. J.; GOMES, B. P. **Effect of root canal procedures on endotoxins and endodontic pathogens.** Oral Microbiol Immunol., v. 22, n. 6, p. 411-8, 2007.

VOTTA, B. J.; WHITE, J. R.; DODDS, R. A.; JAMES, I. E.; CONNOR, J. R.; LEE-RYKACZEWSKI, E. **CKbeta-8 [CCL23], a novel CC chemokine, is chemotactic for human osteoclast precursors and is expressed in bone tissues.** J Cell Physiol., v. 183, p. 196-207, 2000.

XING, Q.; DE VOS, P.; FAAS, M. M.; YE, Q.; REN, Y. **LPS promotes pre-osteoclast activity by up-regulating CXCR4 via TLR-4.** J Dent Res., v. 90, n. 2, p. 157-62, 2011.

WADACHI, R.; HARGREAVES, K. M. **Trigeminal nociceptors express TLR-4 and CD14: a mechanism for pain due to infection.** J Dent Res., v. 85, p. 49-53, 2006.

WANDERSMAN, C.; LE TOFFE, S. **Involvement of lipopolysaccharide in the secretion of Escherichia coli alpha-haemolysin and Erwinia chrysanthemi proteases.** Mol Microbiol., v. 7, p. 141–150, 1993.

WANG, C.; STASHENKO, P. **The role of interleukin-1 in the pathogenesis of periapical bone destruction in a rat model system.** Oral Microbiol Immunol., v. 8, n. 1, p. 50-6, 1993.

WANG, X.; ZHANG, C.; LIN, Q. **Alteration of immunological properties of bacterial lipopolysaccharide by calcium hydroxide treatment.** Zhonghua Kou Quang Yi Xue Za Zhi., v. 36, n. 6, p. 417-20, 2001.

WANG, J.; JIANG, Y.; CHEN, W.; ZHU, C.; LIANG, J. **Bacterial Flora and Extraradicular Biofilm Associated with the Apical Segment of Teeth with Post-treatment Apical Periodontitis.** J Endod., v. 38, p. 954-959, 2012.

WATANABE, T.; KUKITA, T.; KUKITA, A.; WADA, N.; TOH, K.; NAGATA, K. **Direct stimulation of osteoclastogenesis by MIP-1alpha: evidence obtained from studies using RAW264 cell clone highly responsive to RANKL.** J Endocrinol., v. 180, p. 193-201, 2004.

WESTPHAL, O. **Bacterial endotoxins. The second Carl Prausnitz Memorial Lecture.** Int Arch Allergy and Appl Immunol., v. 49, p. 1-43, 1975.

WILDFEUER, A.; HEYMER, B.; SCHLEIFER, K. H.; HAFERKAMP, O. **Investigation of the specificity of the Limulus test for the detection of endotoxin.** Appl Microbiol., v. 28, p. 867-71, 1974.

WILSON, M.; REDDI, K.; HENDERSON, B. **Cytokine inducing components of periodontopathogenic bacteria.** J Periodontal Res., v. 31, p. 393-407, 1996.

WITTGOW, W. C. Jr.; SABISTON, C. B. Jr. **Microorganisms from pulpal chambers of intact teeth with necrotic pulps.** J Endod., v. 1, n. 5, p. 168-71, 1975.

WRIGHT, L. M.; MALONEY, W.; YU, X.; KINDLE, L.; COLLIN-OSDOBY, P.; OSDOBY, P. **Stromal cell-derived factor-1 binding to its chemokine receptor CXCR4 on precursor cells promotes the chemotactic recruitment, development and survival of human osteoclasts.** Bone, v. 36, p. 840-853, 2005.

WU, M. K.; DUMMER, P. M.; WESSELINK, P. R. **Consequences of and strategies to deal with residual post-treatment root canal infection.** Int Endod J., v. 39, n. 5, p. 343-56, 2006.

YAMAGISHI, V. T.; TORNECK, C. D.; FRIEDMAN, S.; HUANG, G. T.; GLOGAUER, M. **Blockade of TLR2 inhibits Porphyromonas gingivalis suppression of mineralized matrix formation by human dental pulp stem cells.** J Endod., v. 37, n. 6, p. 812-8, 2011.

YAMASAKI, M.; NAKANE, A.; KUMAZAWA, M.; HASHIOKA, K.; HORIBA, N.; NAKAMURA, H. **Endotoxin and gram-negative bacteria in the rat periapical lesions.** J Endod., v. 18, n. 10, p. 501-4, 1992.

YEUNG, S. Y.; HUANG, C. S.; CHAN, C. P.; LIN, C. P.; LIN, H. N.; LEE, P. H. **Antioxidant and pro-oxidant properties of chlorhexidine and its interaction with calcium hydroxide solutions.** Int Endod J., v. 40, p. 837-44, 2007.

YU, X.; HUANG, Y.; COLLIN-OSDOBY, P.; OSDOBY, P. **Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) recruits osteoclast precursors by inducing chemotaxis, matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) activity, and collagen transmigration.** J Bone Miner Res., v. 18, p. 1404-1418, 2003.

ZHANG, S.; WANG, Q. Q.; ZHANG, C. F.; SOO, I. **Identification of dominant pathogens in periapical lesions associated with persistent apical periodontitis.** Chin J Dent Res., v. 13, p. 115–21, 2010.

ZOU, Y. R.; KOTTMAN, A. H.; KURODA, M.; TANIUCHI, I.; LITTMAN, D. R. **Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development.** Nature, v. 393, p. 595-599, 1998