



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

NÍVEL: DOUTORADO

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: ENDODONTIA

ANÁLISE, *IN VITRO*, DA REDUÇÃO DE ENDOTOXINAS EM CANAIS RADICULARES CONTAMINADOS, APÓS O EMPREGO DE SISTEMAS DE GÁS OZÔNIO E ELETROFULGURAÇÃO

TIAGO ANDRÉ FONTOURA DE MELO

PORTO ALEGRE

2014

TIAGO ANDRÉ FONTOURA DE MELO

ANÁLISE, *IN VITRO*, DA REDUÇÃO DE ENDOTOXINAS EM CANAIS RADICULARES CONTAMINADOS, APÓS O EMPREGO DE SISTEMAS DE GÁS OZÔNIO E ELETROFULGURAÇÃO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul como requisito para obtenção do título de Doutor em Odontologia, na área de concentração de Endodontia.

Orientador: Prof. Dr. José Antônio Poli de Figueiredo

PORTO ALEGRE

2014

TIAGO ANDRÉ FONTOURA DE MELO

ANÁLISE, *IN VITRO*, DA REDUÇÃO DE ENDOTOXINAS EM CANAIS RADICULARES CONTAMINADOS, APÓS O EMPREGO DE SISTEMAS DE GÁS OZÔNIO E ELETROFULGURAÇÃO

Linha de Pesquisa: Etiopatogênese e Tratamento das Doenças Periodontais e Periapicais

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul como requisito para obtenção do título de Doutor em Odontologia, na área de concentração de Endodontia.

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Renata Grazziotin Soares

Profa. Dra. Maria Martha Campos

Profa. Dra. Maristela Gutiérrez de Borba

Prof. Dr. Alexandre Corrêa Ghisi

Dedicatória

“A família é base da sociedade e o lugar onde as pessoas aprendem pela primeira vez os valores que lhes guiam durante toda sua vida.”

Papa João Paulo II

Primeiramente, à **Deus**, que me deu a vida, esta família maravilhosa e muitos amigos. Por meio da fé e de uma crença, superei dificuldades, incertezas e que a cada dia tenho a convicção do caminho que estou seguindo, dos sonhos que estou almejando e dos objetivos com os quais busco a realizar.

À minha esposa **Fernanda** que sem sombra de dúvida é um exemplo de mulher, companheira, amorosa, prestativa e dedicada. Está ao meu lado desde a época da graduação e que com muita compreensão e paciência soube entender as minhas necessidades quanto ao processo de aprendizagem e qualificação profissional. Está conquista é tua também. Te amo muito!!!

Ao meu filho **Eduardo**, que nasceu neste último ano do Doutorado, mas que esteve presente durante boa parte do curso, trazendo sentimentos de união, afeto, amor e felicidade. Te amo muito, Du!!!

Aos meus pais, **Aristides Melo** e **Maria Liège**, que confesso: nesta segunda dedicatória que os faço está muito mais difícil, devido à emoção presente, para colocar em palavras o que sinto, do que em relação à primeira dedicatória feita na Dissertação de Mestrado em 2007. Agora estou sentindo algo que não havia vivenciado anteriormente: ser PAI!!! Ver a formação e o caminho traçado por um filho, baseado em princípios e valores familiares, deve ser de grande satisfação e uma certeza de que o dever foi cumprido no processo de educação e formação. Vocês são motivos de orgulho e amor, tanto que, se

conseguir transmitir os ensinamentos de vida e da importância de uma família unida aos meus filhos, serei um pai realizado. Amo muito vocês e agradeço tudo o que vocês fizeram por mim e pelos meus irmãos!!!

Aos outros “pilares” da minha família: **Luis, Marcus, Gustavo, Andy, Miriam, Josy, João Marcus, Thais, Bruna e João Vitor**. Como sempre! Vocês estão e estarão sempre presentes em todas as etapas da minha vida e em momentos como este me deram amor, apoio e união. Estarei sempre junto de vocês!!!

Aos meus sogros, **João Inácio e Maria Cristina**, que também vivenciaram esta etapa da minha vida. Gostaria de agradecer a ajuda e a compreensão que tiveram comigo e com a Fernanda no período que moramos com vocês durante o meu Doutorado. Muito obrigado por tudo!!!

A todos os meus familiares, que sempre me apoiaram, com gestos e palavras de incentivo, durante toda a minha formação profissional.

Tenham certeza de uma coisa: vocês todos sempre estarão em meu coração.

Amo muito Vocês!!!

Agradecimento Especial

“O processo de formação é tanto mais feliz e gratificante quanto mais as suas diversas fases assumirem o caráter de acontecimentos vividos.”

Hugo Von Hofmannsthal

Por isso, eu não poderia deixar passar em branco este momento para agradecer a TODOS, que de uma forma muito especial, passaram e FICARAM marcados durante a minha formação acadêmica e profissional. Nunca é tarde demais para lembrar e demonstrar o reconhecimento a pessoas que foram fundamentais para minha qualificação.

À **Profa. Dra. Maristela Gutierrez de Borba**, que foi a grande responsável e incentivadora por eu gostar e me direcionar para esta especialidade, durante os cinco anos de convívio que tivemos na época da graduação na disciplina de Endodontia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS). Minha eterna gratidão, pois sem sombra de dúvida o amor que você tem pela endodontia me cativou e me encantou para seguir nesta área da Odontologia tão fantástica e desafiadora.

Ao **Prof. Dr. Elias Pandonor Motcy de Oliveira**, que, sem sombra de dúvida, foi uma das melhores pessoas, um grande amigo, que tive e que tenho ainda a satisfação de conviver. O Prof. Elias foi meu orientador no Mestrado. É uma pessoa de admirável respeito, com o qual aprendi muito de pesquisa, da importância do trabalho em equipe, entre outros ensinamentos. É um verdadeiro “Paizão” com o qual conto ainda a qualquer hora para tirar dúvidas e receber conselhos na Endodontia e na carreira docente. Por meio de sugestões e incentivos, hoje estou finalizando o Doutorado e “colhendo os frutos” com o ingresso na carreira docente. Esta conquista também é sua!!!

Ao **Prof. Dr. Francisco Montagner**, que tive o privilégio de conviver na coorientação do Doutorado e também na supervisão das atividades experimentais realizadas na Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). O Prof. Francisco, embora jovem como eu, é como se fosse um “irmão mais velho” que quando “pequenos” admiramos pelas suas ações e atitudes. É uma pessoa responsável, prestativa e admirável pelas suas atividades exercidas na Endodontia e na Comunidade Científica. É um grande pesquisador, que ama o que faz, que não mede esforços para ajudar e que tive a satisfação de conhecer e de se tornar amigo. Um grande abraço e obrigado por tudo!!!

À **Profa. Dra. Fabiana Vieira Vier Pelisser**, minha orientadora no Doutorado. Sempre quando vou assumir novos desafios e tenho a oportunidade de tomar atitudes na minha vida, eu reflito, analiso e vou em busca de informações para conhecer com quem vou conviver e trabalhar. Pois bem, Fabi!!! As referências que tive da senhora foram as melhores possíveis e que pude confirmar e presenciar ao longo do curso. Você foi uma pessoa que com certeza selou, até o presente momento, o ciclo (Graduação, Mestrado e Doutorado) com “chave” de ouro!! Tive a sorte ou destino de ser orientado e ter convivido com excelentes pessoas, amigas e profissionais!! Assim como o Prof. Francisco, lhe considero uma irmã! Uma pessoa amiga, serena, dedicada, responsável, disponível a todo e qualquer momento e que proporcionou a realização desse trabalho de uma forma muito mais tranquila frente às inúmeras dificuldades e intercorrências que tivemos ao longo do curso com relação ao assunto da Tese e a execução da parte experimental. Muito obrigado por tudo!!

À **Profa. Dra. Roberta Kochenborger Scarparo**, que no início do Doutorado me acolheu ao programa e me ajudou na montagem e confecção do projeto de pesquisa da Tese. Quis o destino que você selasse, nesta reta final do curso, o meu Doutorado como

orientadora, juntamente com o Prof. Figueiredo. Muito obrigado pelos conselhos, ensinamentos e pela disponibilidade em querer me ajudar na finalização da Tese.

Ao **Prof. Dr. José Antônio Poli de Figueiredo**, que tive o prazer de conhecer e conviver, e que também foi extremamente importante para execução e finalização do meu Doutorado. Posso afirmar que fui uma pessoa privilegiada, pois não tive somente um orientador no Doutorado, mas sim, QUATRO!!! Prof. Figueiredo, você é uma pessoa exemplar na qual me tornei um admirador pelos seus ensinamentos, amizade e exemplo de dedicação ao ensino superior e a pesquisa científica. Muito obrigado por tudo!!

Claro!! Acredito que o ciclo ainda não se encerrou, pois futuramente, quem sabe, pretendo realizar o Pós-Doutorado; e que, se possível, espero conviver e ter algum de vocês como orientador nesta nova etapa da minha vida!!

Agradecimento aos Amigos

“Ser amigo é...andar junto, mesmo que distante. É ser legal, jamais superficial. Dizer o que pensa, sem ofensa. Calar para ouvir, sem intervir. Falar sem rodeio, sem receio. Guardar o segredo, secar o pranto, dar o ombro.

Estar para o que der e vier, e jamais abandonar. É ser alguém com que sempre se pode contar. Ser amigo, afinal, é ser Especial.”

Autor Desconhecido

Aos meus colegas de graduação, **Eduardo Valdez, Francisco Comparsi, Guilherme Schuwartzman, Gustavo Sebben, Joaquim Beck, Josué Broilo, Marcelo Castilhos, Marcelo Bacaltchuk, Max Kuckzinsk e Rafael Ercolani**, que estiveram ao meu lado, dando força, para que eu continuasse a lutar em busca da minha felicidade e de minhas realizações.

Aos meus grandes amigos **Renata Grazziotin Soares e Gustavo Golgo Kunert**, que convivo desde o tempo do mestrado e que sempre estiveram dispostos a ajudar.

À colega do Doutorado **Grasiela Gründling**, que além de ser uma grande amiga eu já considerado da família. Muito obrigado pela convivência, pela ajuda e pelo trabalho em equipe que fizemos para execução da parte experimental de nossas pesquisas.

Ao **Prof. Dr. Itaborai Kunert**, que tenho enorme admiração e respeito pelos seus trabalhos em prol de uma Endodontia de “Excelência”. Um grande amigo que posso contar a qualquer momento e que torce pelo crescimento daqueles que estão a sua volta.

Aos meus colegas da **Policlínica Militar**, pessoas com as quais convivo e que me motivaram e torceram por mim neste período do Doutorado.

Aos colegas do curso de Especialização em Endodontia da São Leopoldo Mandic (SP) – unidade Porto Alegre, **Luis Eduardo Irala, Alexandre Salles, Mario Queiróz, Gustavo Kunert, Kathrein Tapia e Cauana Tavares**, muito obrigado pela amizade, pelo convívio e pelos momentos alegres que passamos juntos.

Aos colegas da disciplina de Endodontia da Faculdade da Serra Gaúcha (FSG), **Paulo Zanettini, Alcides Oliveira, Caroline Berwanger e Cláudia Wagner**, muito obrigado pelo apoio nos momentos que tive de me dedicar ao Doutorado e pela amizade que se formou entre nós como uma equipe.

Aos demais colegas, do Mestrado e do Doutorado da PUCRS, especialmente a **Magda Reis, Cauana Tavares, Daiana Giannastasio e Gabriela Fagundes**, pela demonstração de carinho e amizade durante esses anos do curso.

A todos meus amigos, muito obrigado por saber que vocês fazem parte da minha vida e que uma amizade não se desfaz mesmo na ausência.

Agradecimento aos Colaboradores

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

Cora Coralina

À **PUCRS** e ao **Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia**, pela oportunidade que me deram de fazer parte deste excelente programa.

Aos **Funcionários da Pós-Graduação**, por estarem sempre disponíveis em todos os momentos que precisei.

À **UFRGS**, por ter me aberto as portas e disponibilizado as suas dependências para realização da parte experimental da Tese.

Ao **Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Oral da Faculdade de Odontologia da UFRGS**, em especial à laboratorista **Luiza Mercado**, meus agradecimentos pela acolhida e dedicação dispensada, tornando possível a realização deste estudo.

À colega **Grasiela Gründling**, pela ajuda na execução das etapas experimentais da Tese.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS)**, pelo fornecimento da bolsa que me possibilitou a conclusão deste Doutorado.

À **MK Life®**, representada pelo **Dr. Michel Klymus**, que investiu, participou e apoiou a realização deste estudo.

Ao **Prof. Dr. José Antônio Poli de Figueiredo** e ao **Dr. Alcione Luiz Scur**, por me fornecerem os sistemas, **OZY®** e **Endox®**, utilizados no estudo.

À **Lonza do Brasil Especialidades Químicas Ltda.**, representada pela assessora técnica **Helene Peters Carvalho Barbosa**, pelo empenho e auxílio na realização da parte experimental com as endotoxinas.

À **CBE/EMBRARAD – Empresa Brasileira de Radiações Ltda. (Cotia/SP)**, pela realização do processo de esterilização dos materiais do estudo.

Ao **Prof. Dr. José Antônio Poli de Figueiredo** e ao **Prof. Dr. Marcus Vinícius Reis Só**, pelas sugestões e pelas considerações que fizeram no momento da defesa do projeto da Tese.

À **Profa. Dra. Marly MacFarlane**, pelo empenho na realização da tradução dos artigos da Tese para o idioma inglês.

Ao estatístico **Prof. Dr. Mário Bernardes Wagner**, pelo empenho na realização da análise estatística.

Ao **Exército Brasileiro**, aqui representado pelo **TC Med Cordeiro**, diretor da Policlínica Militar de Porto Alegre, e pelos **TC Dent Daniel**, **Maj Dent Dilli** e **Cap Dent Belkiss**, chefes do setor de Odontologia e Endodontia, por ter me possibilitado, facilitado e incentivado a realização do Doutorado.

À **São Leopoldo Mandic (SP) – unidade Porto Alegre**, representada pelo Diretor, **Dr. Miguel Álvaro Santiago Nobre**, pela motivação no crescimento docente de seus professores.

À **FSG**, representada pelo Diretor, **Dr. Felipe de Vargas**, e pelo Coordenador do curso de Odontologia, **Prof. Dr. Rogério Brasiliense Elsemann**, pelo incentivo dado para a qualificação de seus professores.

E a todos que, de alguma maneira, participaram na concretização deste trabalho.

“Se quiser triunfar na vida, faça da perseverança a
sua melhor amiga; da experiência, o seu conselheiro;
da prudência, o seu irmão mais velho; e da
esperança, o seu anjo da guarda.”

Joseph Addison

Resumo

A presença da endotoxina (LPS) bacteriana no sistema de canais radiculares está relacionada com a manutenção e evolução das doenças pulpares e periapicais. Até o momento, não há nenhuma técnica ou material que seja completamente eficaz na eliminação do LPS. Logo, com objetivo de aprimorar o processo de desinfecção e, consequentemente, aumentar as taxas de sucesso no tratamento endodôntico, tem-se buscado alternativas aos protocolos clínicos realizados atualmente. A utilização de equipamentos auxiliares com princípios de ação baseados na eletrofulguração e no potencial de aplicação do gás ozônio surge como alternativas. Sendo assim, o primeiro artigo desta tese buscou, inicialmente, verificar a viabilidade para utilização de dentes bovinos ao invés de humanos, em experimentos *in vitro* com contaminação por LPS, tendo em vista não haver estudos na literatura com essa metodologia. Para isso, vinte incisivos centrais bovinos (B) e vinte pré-molares monorradiculares humanos (H) tiveram suas coroas dentárias removidas e comprimento radicular padronizado em 16 mm. Os canais radiculares foram preparados até o instrumento tipo K nº. 60 e submetidos à esterilização por radiação gama com cobalto 60. De acordo com os dois tipos de espécies dentárias, os dentes foram divididos aleatoriamente em dois subgrupos, positivo (P) e negativo (N). Os canais dos grupos positivos (HP e BP) foram inoculados com LPS de *Escherichia coli* (O55:B5). Já os canais dos grupos negativos (HN e BN) foram apenas expostos à água apirogênica. Após a incubação dos dentes, a 37°C, com umidade atmosférica durante 24 horas, amostras das soluções do canal principal foram coletadas com pontas de papel absorvente apirogênicas. A quantificação dos níveis de LPS foi feita por *Limulus Amebocytes Lysate* (LAL) e os dados obtidos foram submetidos à ANOVA de uma via, seguido de Post Hoc Tukey, com nível de significância de 5%. Os resultados demonstraram que houve diferença significativa ($P < 0,001$) entre os dois modelos experimentais. A utilização de dentes bovinos não apresentou ser a melhor opção dentária para pesquisas laboratoriais com contaminação por LPS. Foi realizado, então, o segundo artigo da Tese a fim de verificar o efeito do gás ozônio (sistema OZY®) e de pulsos elétricos de alta frequência (sistema Endox®) em canais radiculares humanos previamente contaminados com LPS. Cinquenta pré-molares unirradiculares receberam o mesmo protocolo para preparo da amostra relatado no primeiro artigo. De-

pois de prontos, os espécimes foram divididos em cinco grupos (n=10), de acordo com o protocolo de desinfecção instituído: Sistema *OZY*®, um pulso de 120 segundos (*OZY* 1p); Sistema *OZY*®, quatro pulsos de 24 segundos (*OZY* 4p); Sistema *Endox*® (*ENDO*X). Canais contaminados e não contaminados, apenas expostos à água apirogênica, foram utilizados como controle positivo (C+) e negativo (C-), respectivamente. O LPS de *Escherichia coli* (O55:B5) foi inoculado nos canais radiculares, exceto nos dentes do grupo C-. Após os protocolos de desinfecção, amostras do fluido foram coletadas dos canais com pontas de papel apirogênicas. O método para quantificação dos níveis de LPS e a análise estatística empregada também foram os mesmos descritos no primeiro artigo. Os resultados mostraram que os protocolos de desinfecção não foram capazes de reduzir significativamente os níveis de LPS. O uso do gás ozônio e de pulsos elétricos de alta frequência não foram eficazes na eliminação do LPS em canais radiculares.

Palavras-Chave (DeCS): Endodontia; Microbiologia; Tratamento do Canal Radicular; Endotoxinas; Equipamentos e Provisões.

Abstract

The presence of bacterial endotoxin (LPS) in the root canal system is related to the maintenance and evolution of the pulp and periapical diseases. So far, there is none technical or material that is completely effective in eliminating the LPS. Therefore, in order to enhance the disinfection process, and thereby, to increase the success rate of endodontic treatment, it has been sought alternatives to clinical protocols held nowadays. The use of auxiliary equipments with principles of action based on electrofulguration and in the potential application of ozone gas appears as an alternatives. Thus, the first article of this thesis initially sought to verify the feasibility for the use of bovine teeth instead of human teeth, in *in vitro* experiments with contamination by LPS, because there are no studies in the literature using this methodology. For this, twenty bovine (B) central incisors and twenty single-rooted human (H) premolars had removed their dental crowns and standardized their root length to 16 mm. The root canals were prepared until size 60 K-type instrument and subjected to sterilization by gamma irradiation with 60 cobalt. According to the two types of dental species, the teeth were randomly divided into two subgroups, positive (P) and negative (N). The root canals of the positive groups (HP and BP) were inoculated with *Escherichia coli* LPS (O55:B5). The root canals of negative groups (HN and BN) were exposed only to a pyrogenic water. After the teeth incubation in a 37°C atmospheric humidity during 24 hours, the samples of the solutions from the main root canals were collected with a pyrogenic absorbent paper points. The quantification of the levels of LPS was made by Limulus Amebocytes Lysate (LAL) and data were subjected to oneway ANOVA, followed by Tukey post hoc, with a 5% significance level. The results showed significant differences ($P < 0,001$) between the two experimental models. The use of bovine teeth showed not to be the best option for LPS contamination studies. Following this result, a second article of the Thesis was performed in order to verify the effect of ozone gas (OZY® system) and high frequency electric pulses (Endox® System) in human root canals previously contaminated by LPS. Fifty single-rooted premolars received the same protocol for root canals preparation, as reported in the first article. Once ready, the specimens were divided into five groups (n=10), according to the disinfection protocol established: OZY® System, one 120-second-pulse (OZY 1p); OZY® System, four 24-

second-pulses (OZY 4p); Endox® System (ENDOX). Contaminated and non-contaminated canals, exposed only to apyrogenic water, were used as positive (C+) and negative (C-) controls, respectively. The *Escherichia coli* LPS (O55:B5) was inoculated into the root canals, except in the C- group teeth. After performing the disinfection protocols, fluid samples were collected from the canals using apyrogenic paper tips. The method for quantification of LPS levels and statistical analysis were the same as described in the first article. The results showed that the disinfection protocols were unable to reduce significantly the LPS levels. The use of ozone gas and high frequency electric pulses were not effective in the elimination of LPS in root canals.

Keywords (DeCS): Endodontics; Microbiology; Root Canal Therapy; Endotoxins; Equipment and Supplies.

Lista de Abreviaturas

Av. = avenida

B = bovino

Biopure MTAD = ácido cítrico 4,25%, polisorbato 80, água e doxiciclina 3%

BN = bovino negativo

BP = bovino positivo

C- = controle negativo

C+ = controle positivo

CAP = capitão

CEP (endereço) = Código de Endereçamento Postal

CEP = Comitê de Ética em Pesquisa

D0 = diâmetro zero

DDS = Doctor of Dental Surgery

DeCS = Descritores em Ciências da Saúde

DENT = dentista

Dr. = Doutor

Dra. = Doutora

EDTA = Ácido Etilenodiamino Tetra-acético

EMBRARAD = Empresa Brasileira de Radiações

et al. = entre outros

EU/mL = unidade de endotoxina por mililitro

FAPERGS = Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul

FSG = Faculdade da Serra Gaúcha

g/mol = grama / quantidade de substância

H = humano

HN = humano negativo

HP = humano positivo

IL = interleucina

ISO = International Organization for Standardization

Jr. = Júnior

kGy = quilogray

kHz = quilohertz

LAL = Limulus Amebocytes Lysate

LPS = lipopolissacarídeo

Ltda = limitada

MAJ = major

MED = médico

mL = mililitro

mm = milímetro

MSc = Master of Science

N = Newton

N (subgrupo) = negativo

n = número de observações na série

n°. = número

Nd:YAG = neodímio-ítrio-alumínio-granate

NiTi = níquel-titânio

nr. = número

Oneway ANOVA = Análise de Variância de uma via

O₃ = Ozônio

P ou p (estatístico) = probabilidade de significância

P (subgrupo) = positivo

PhD = Philosophy Doctor

Prof. = professor

Profa. = professora

PUCRS = Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

r = coeficiente de correlação linear

RS = Rio Grande do Sul

S.A. = Sociedade Anônima

Sec. = second

spp = espécies

TC = tenente coronel

TNF = fator de necrose tumoral

UFRGS = Universidade Federal do Rio Grande do Sul

WL = working length

μL = microlitro

μm = micrômetros

$^{\circ}\text{C}$ = graus celsius

% = porcentagem

\pm = aproximadamente

β = beta

® = registrado

= número

1/10 = um décimo

1p = um pulso

4p = quatro pulsos

< = menor

≤ = menor ou igual

Lista de Anexos

Anexo A – Carta de aprovação pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia/PUCRS.

Anexo B – Carta de aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)/PUCRS.

Anexo C – Carta de submissão do Artigo de Pesquisa 1 ao periódico *Dental Materials*.

Anexo D – Carta de submissão do Artigo de Pesquisa 2 ao periódico *Journal of Endodontics*.

Sumário

Introdução	26
Infecções Endodônticas.....	26
Sistema de Eletrofulguração.....	29
Sistema de Gás Ozônio.....	32
Objetivos	36
Objetivo Geral.....	36
Objetivos Específicos.....	36
Artigo de Pesquisa 1	38
ABSTRACT.....	40
INTRODUCTION.....	41
MATERIALS AND METHODS.....	42
RESULTS.....	45
DISCUSSION.....	46
REFERENCES.....	48
FIGURE LEGEND.....	53
Artigo de Pesquisa 2	55
ABSTRACT.....	57
INTRODUCTION.....	58
METHODS.....	59
RESULTS.....	63
DISCUSSION.....	63
REFERENCES.....	66

FIGURES LEGENDS.....	70
Discussão Geral.....	73
Conclusões.....	83
Referências.....	85
Anexos.....	95
Anexo A – Carta de aprovação pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia/PUCRS.....	95
Anexo B – Carta de aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)/PUCRS.....	96
Anexo C – Carta de submissão do Artigo de Pesquisa 1 ao periódico <i>Dental Materials</i>	100
Anexo D – Carta de submissão do Artigo de Pesquisa 2 ao periódico <i>Journal of Endodontics</i>	101

Introdução

Introdução

Infecções Endodônticas

Um dos objetivos do tratamento endodôntico é promover a limpeza, a desinfecção e a manutenção dessas condições no interior do sistema de canais radiculares.

Embora inúmeros fatores químicos e físicos, como descrito por Stashenko *et al.* (1998), possam induzir um processo inflamatório, vários estudos têm demonstrado que os microrganismos e seus subprodutos, tais como as endotoxinas, desempenham um papel fundamental na indução e manutenção das doenças pulpares e perirradiculares (SIQUEIRA JR., 2002; PINHEIRO *et al.*, 2003; VIANNA *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2012).

Por volta do ano de 1894, Müller, por meio da análise bacteriológica de esfregaços obtidos de canais radiculares com necrose pulpar, evidenciou-se a presença de bactérias. Mas, somente com o estudo clássico de Kakehashi *et al.*, em 1965, a importância das bactérias no desenvolvimento das doenças pulpares e perirradiculares foi confirmada. Ao expor a polpa dental de ratos convencionais e “germ-free” à cavidade oral, pode-se observar a formação de necrose pulpar e lesão perirradicular somente nos ratos convencionais. Segundo Siqueira Jr. *et al.* (2011), uma diversidade de espécies bacterianas, que podem estar presentes na cavidade bucal, são capazes de colonizar o sistema de canais radiculares.

Quando a polpa dentária fica em contato direto ou indireto ao meio bucal, inicia-se um processo de contaminação com predomínio de microrganismos aeróbios e facultativos. Isso decorre, principalmente, de relações nutricionais existentes entre as espécies microbianas, juntamente com a diminuição nos níveis de oxigênio ao longo do canal radicular, quando passa a haver um predomínio de microrganismos anaeróbios

(SUNDQVIST, 1992). Hoje, com os avanços tecnológicos na cultura e identificação microbiológica, já se sabe que em dentes com necrose pulpar e sem intervenção endodôntica, a colonização microbiana é mista, com espécies gram-positivas e gram-negativas, principalmente com predomínio de anaeróbios (CHEUNG; HO, 2001; SIQUEIRA JR.; RÔÇAS, 2009; MURAD *et al.*, 2014; TENNERT *et al.*, 2014). Além disso, de acordo com Martinho *et al.* (2014a), algumas bactérias possuem fatores de virulência e componentes estruturais (cápsula, LPS, peptidoglicano, fímbrias, lipoproteína e ácido lipoteicoico) que são capazes de induzir e manter o processo infeccioso.

A endotoxina é um mediador imunológico altamente potente que consiste em um complexo de lipopolissacarídeos, integrantes da membrana externa da parede celular de bactérias gram-negativas, que é liberada durante sua multiplicação ou morte (SCHEIN; SCHILDER, 1975; NAIR, 2004; WILLIAMSON *et al.*, 2005). Segundo Jacinto *et al.* (2005), Martinho e Gomes (2008) e Oliveira *et al.* (2012), a endotoxina é um importante mediador na patogênese da periodontite apical. Contudo, já se sabe, por meio de alguns estudos, que a molécula lipídica A da endotoxina é a responsável pelos efeitos tóxicos da mesma (MORRISON; KLINE, 1977; DIXON; DARVEAU, 2005).

As endotoxinas são responsáveis por vários efeitos biológicos importantes, tais como, a quimiotaxia de neutrófilos, a ativação de macrófagos e do sistema complemento e a liberação de mediadores inflamatórios (TNF-alfa, IL-1, IL-6 e IL-8) (LEONARDO *et al.*, 2004; MAEKAWA *et al.*, 2011). A presença desses mediadores acarretará, por consequência, a atração de osteoclastos para a região, iniciando um processo de reabsorção óssea (HONG *et al.*, 2004; ENDO *et al.*, 2012). Em 2010a, Martinho *et al.* verificaram que os níveis mais elevados de endotoxinas foram seguidos por um aumento da produção de IL-1 β , principalmente em dentes com uma maior área de reabsorção óssea junto aos tecidos periapicais.

Além desses efeitos biológicos, a endotoxina, devido ao seu baixo peso molecular, é capaz de penetrar a uma profundidade quatro vezes maior no interior dos túbulos dentinários do que a própria bactéria (BERKITTEN *et al.*, 2000; GOMES *et al.*, 2009), sendo também possível verificar a sua infiltração junto a materiais endodônticos obturadores (ALVES *et al.*, 1998).

Clinicamente, inúmeros estudos, tais como, o de Horiba *et al.* (1991) e Khabbaz *et al.* (2001), têm observado uma correlação entre a presença e os níveis de endotoxinas no sistema de canais radiculares com as características descritas nos quadros patogênicos.

Para exemplificar, Jacinto *et al.* (2005) verificaram que uma concentração mais elevada de endotoxinas foi observada em casos clínicos de dentes com dor espontânea e à palpação, sensibilidade à percussão e com presença de exsudato purulento no interior do sistema de canais radiculares.

Em 1975, Schein e Schilder já postulavam que doenças periodontais e periapicais são processos biológicos semelhantes. Com a constatação de que o aumento nos níveis de endotoxinas junto ao exsudato gengival está de acordo com o grau de inflamação periodontal. Podendo assim também, na Endodontia, correlacionar à concentração de endotoxinas no interior do sistema de canais radiculares com o grau de patogenia existente.

Devido a tudo isso, a Endodontia tem tentado buscar soluções para eliminar ou inativar as endotoxinas bacterianas, que perpetuam o processo infecto-inflamatório no sistema de canais radiculares e nos tecidos periapicais.

Até o momento, nenhum protocolo ou substância testados foram completamente eficazes e efetivos contra a endotoxina bacteriana, seja com o emprego de diferentes soluções irrigadoras, tais como, o hipoclorito de sódio e o digluconato de clorexidina

(GOMES *et al.*, 2009), seja com o uso do hidróxido de cálcio como medicação intracanal (SIGNORETTI *et al.*, 2011).

A comunidade científica tem observado que a completa erradicação dos microrganismos e de suas endotoxinas no interior do sistema de canais radiculares contaminados não é cem por cento viável na prática clínica (VIANNA *et al.*, 2007; MARTINHO *et al.*, 2010; XAVIER *et al.*, 2013). A persistência de microrganismos e de seus subprodutos, após serem utilizados todos os recursos e tomadas as medidas disponíveis para sanificação do canal radicular, ocorre tanto em infecções endodônticas primárias quanto em infecções associadas ao insucesso do tratamento.

Na tentativa de aprimorar o processo de desinfecção, e, conseqüentemente, elevar as taxas de sucesso no tratamento endodôntico, têm-se buscado alternativas para o protocolo clínico. Dentre os materiais pesquisados e desenvolvidos, há dois equipamentos auxiliares, um deles com princípio de ação baseado na eletrofulguração (sistema *Endox*®) e o outro com potencial de aplicação do gás ozônio (sistema *OZY*®).

Sistema de Eletrofulguração

O *Endox*® *Endodontic System* (Lysis srl, Milano, Itália) é um sistema digital de eletrofulguração, empregado no tratamento endodôntico, que possui duas finalidades: atua como localizador foraminal (HAFFNER *et al.*, 2005), por impedância e, promove a redução do conteúdo microbiano no interior do sistema de canais radiculares (ARANDA-GARCIA *et al.*, 2012).

Para o seu funcionamento, este equipamento utiliza uma agulha de aço inoxidável fino cirúrgico 420, como um eletrodo ativo, que é introduzida no interior do canal radicular e, um eletrodo neutro que é colocado próximo à região trabalhada ou mantido na mão do paciente, de acordo com a finalidade desejada. Para o emprego como recurso

auxiliar na desinfecção do sistema de canais radiculares, o aparelho é acionado e uma descarga de corrente elétrica alternada de alta frequência (600 kHz) é gerada, vaporizando o eventual conteúdo do canal (LENDINI *et al.*, 2005; VIRTEJ *et al.*, 2007; CASSANELLI *et al.*, 2008).

Segundo Lendini *et al.* (2005), com a aplicação do sistema de eletrofulguração ocorrem três efeitos principais: aumento da temperatura (entre 300 a 500°C), aumento da porcentagem de gás ozônio, devido à ionização do meio e, produção de radiação ultravioleta. Este último efeito é um subproduto da faísca gerada pelo fluxo de elétrons no interior do meio.

Com relação ao aumento na temperatura após a ativação da corrente, mensurações feitas *in vitro* estimaram que o aumento na zona apical atinge um valor máximo de $19 \pm 4^\circ\text{C}$ após cada pulso elétrico, sendo que não parece danificar as estruturas perirradiculares (HAFFNER *et al.*, 1999b). De acordo com outros estudos, um aumento de 10°C , mantido por um minuto, é considerado compatível para ocorrer uma reparação óssea normal, mas temperaturas mais altas ou, com a realização de mais pulsos de aplicação pode haver necrose tecidual (ERIKSSON; ALBREKTSSON, 1983).

No que se refere à ação antimicrobiana, o sistema *Endox*® é considerado um método inovador para o tratamento das infecções endodônticas (LENDINI *et al.*, 2005), pois danifica a membrana celular dos microrganismos (CASSANELLI *et al.*, 2008). Porém, não há na literatura nenhum estudo sobre o poder de ação desse sistema em relação à endotoxina bacteriana.

Em seu estudo *in vitro*, em 2008, Cassanelli *et al.* constataram que, após a aplicação do sistema *Endox*®, houve um melhor poder de ação do antibiótico bactericida rifampicina sobre cepas de *Escherichia coli*. Isso provavelmente ocorre devido ao princípio deste sistema que, pela geração de uma corrente elétrica de alta frequência, altera a

permeabilidade da membrana bacteriana com a criação de poros sobre a sua superfície. Segundo os próprios autores, isso poderia sugerir como protocolo a associação de substâncias ou medicações com o sistema de eletrofulguração, a fim de aumentar o poder de letalidade.

Estudos como o de Haffner *et al.* (1999a) e Roveta *et al.* (2004) verificaram um excelente poder de desinfecção do sistema *Endox*® junto a canais radiculares contaminados, o que pôde ser confirmado no estudo de Cassanelli *et al.* (2004), no qual houve atividade letal sobre espécies microbianas gram-positivas e negativas, como *Candida albicans*, *Actinomyces spp* e *Bacillus subtilis*. Tais resultados apontam para uma nova alternativa no uso do sistema de eletrofulguração, como um recurso auxiliar no processo de desinfecção do canal radicular.

Virtej *et al.* (2007) encontraram resultados diferentes dos supracitados ao compararem o desempenho antimicrobiano do sistema de eletrofulguração *Endox*®; à base de gás ozônio, o *HealOzone*® e, de diferentes substâncias antimicrobianas, tais como, Biopure MTAD e a solução de hipoclorito de sódio a 3%. Verificaram que, embora nenhum método tenha sido totalmente eficaz, o *Endox*® apresentou os piores resultados. Da mesma forma, Karale *et al.* (2011) e Aranda-Garcia *et al.* (2012) também observaram que nenhum dos materiais testados, inclusive o sistema *Endox*®, apresentou total eficácia na eliminação de cepas de *Enterococcus faecalis*, demonstrando a persistência de contaminação no interior do sistema de canais radiculares.

Uma das únicas contraindicações ao sistema *Endox*®, verificada na literatura, é com relação à utilização do mesmo em pacientes portadores de dispositivos cardíacos, como, o marcapasso (LENDINI *et al.*, 2005).

Sistema de Gás Ozônio

O ozônio (O₃, peso molecular de 47,98g/mol) é um composto altamente instável que, dependendo das condições do sistema, como temperatura e pressão, se decompõe em oxigênio puro. Com o processo de decomposição, produz-se, além do oxigênio molecular, o oxigênio atômico, substância altamente reativa, com capacidade de oxidar metais não nobres e de atacar compostos orgânicos (STÜBINGER *et al.*, 2006).

No entanto, em pesquisas realizadas na área da saúde, como na Medicina, têm-se verificado efeitos benéficos na utilização do ozônio como forma terapêutica. Górnicki e Gutsze (2000) observaram que após a aplicação do ozônio sobre eritrócitos, ocorre uma alteração nas proteínas do seu citoesqueleto, aumentando, assim, as propriedades de modelagem na sua membrana elástica. Com esta mudança, pode-se evitar a aderência entre os eritrócitos, uma maior facilidade na sua passagem por capilares de menor calibre e um maior estímulo ao fluxo sanguíneo. Além disso, segundo Emerson *et al.* (1982) e Dyas *et al.* (1983), o ozônio tem uma forte ação bactericida, virucida e fungicida, tornando-se, assim, um potente agente terapêutico em processos inflamatórios e infecciosos. Devido ao seu poder de oxidação proteica, o ozônio tem a capacidade de danificar a membrana ou parede celular microbiana, aumentando a sua permeabilidade e, favorecendo, conseqüentemente, a entrada de moléculas de ozônio, desencadeando assim a sua morte (STÜBINGER *et al.*, 2006; POLYDOROU *et al.*, 2012).

Hoje, estudos clínicos e laboratoriais têm analisado o seu efeito nas diferentes especialidades: Cariologia, efeito antimicrobiano sobre lesões cariosas (ZAURA *et al.*, 2007; HAUSER-GERSPACH *et al.*, 2009); Dentística Restauradora, influência sobre os sistemas adesivos (MAGNI *et al.*, 2008; GURGAN *et al.*, 2010); Prótese Dentária, desinfecção de próteses removíveis (MURAKAMI *et al.*, 1996); Periodontia, tratamento da hipersensibilidade dentinária (AZARPAZHOOH *et al.*, 2009) e de doenças periodon-

tais ativas (GARDUÑO *et al.*, 1995) e Cirurgia, aplicação profilática contra infecções após procedimentos de osteotomia (FILIPPI, 1993). Com relação à área de Endodontia, o ozônio tem sido testado quanto ao poder antimicrobiano sobre cepas bacterianas comumente isoladas em infecções endodônticas primárias e secundárias (HEMS *et al.*, 2005; CASE *et al.*, 2012).

Em 2005, Hems *et al.* avaliaram a efetividade do ozônio sobre cepas de *Enterococcus faecalis* na forma planctônica e em biofilme, em diferentes períodos de tempo (30, 60, 120 e 240 segundos). A solução de hipoclorito de sódio a 2,5% foi utilizada no grupo controle. Embora a aplicação do ozônio não tenha sido tão eficaz contra biofilmes de *Enterococcus* quando comparado ao hipoclorito de sódio, ele apresentou um efeito antibacteriano contra este tipo de cepa, na forma planctônica, após um período de 240 segundos. Müller *et al.* (2007) constataram que biofilmes bem estabelecidos são resistentes a ação do ozônio, o que está de acordo com os resultados obtidos no estudo supracitado de Hems *et al.*

Outros estudos, como o de Stoll *et al.* (2008) e Kustarci *et al.* (2009) também observaram um poder de desinfecção com o uso do ozônio sobre cepas microbianas de *Enterococcus faecalis* colonizadas no interior de canais radiculares; porém, o uso da solução de hipoclorito de sódio apresentou-se mais eficaz. Para Case *et al.* (2012), o ozônio pode ser utilizado como um complemento ao processo de desinfecção endodôntica.

Por outro lado, Nagayoshi *et al.* (2004) verificaram que a água ozonizada associada ao uso do sistema de ultrassom teve quase o mesmo poder antimicrobiano que a solução de hipoclorito de sódio a 2,5%, sobre túbulos dentinários de dentes bovinos infectados com *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus mutans*, tornando-se, assim, um procedimento alternativo de tratamento. Da mesma forma, esta eficácia foi também

observada nos estudos de Pereira *et al.* (2005), sobre cepas cultivadas em placas de Petri de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*; Johansson *et al.* (2009), com *Actinomyces naeslundii*, *Lactobacillus casei* e *Streptococcus mutans*; e Huth *et al.* (2009), com *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, *Peptostreptococcus micros* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Já, com relação à ação do ozônio sobre a redução ou neutralização de endotoxinas bacterianas foi encontrado na literatura apenas um estudo (CARDOSO *et al.*, 2008) com o emprego de água ozonizada, o qual não mostrou nenhum grau de efetividade.

Além da ação antimicrobiana, a análise da citotoxicidade e biocompatibilidade de matérias e equipamentos é de extrema relevância. No estudo de Huth *et al.* (2006), os pesquisadores analisaram o poder de citotoxicidade do ozônio, gasoso e aquoso, e de outros irrigantes (digluconato de clorexidina e hipoclorito de sódio) sob reculturas de células epiteliais bucais humanas e sobre fibroblastos gengivais. O ozônio apresentou menor toxicidade em comparação aos outros antissépticos utilizados. O mesmo pôde ser verificado no estudo de Nagayoshi *et al.* (2004). Segundo Polydorou *et al.* (2012), a baixa citotoxicidade do ozônio se deve a sua rápida degradação após o contato com compostos orgânicos.

Apesar dos inúmeros estudos descritos acerca da utilização do ozônio e da eletrofulguração, ainda existem poucas informações com relação ao efeito desses aparelhos sobre a neutralização e eliminação da endotoxina bacteriana presente em canais radiculares contaminados.

Objetivos

Objetivos

Objetivo Geral

Avaliar a eficácia dos sistemas de gás ozônio e de eletrofulguração no processo de desinfecção de canais radiculares contaminados previamente por endotoxinas de *Escherichia coli* (O55:B5).

Objetivos Específicos

- Avaliar a viabilidade de experimentos *in vitro* com contaminação por endotoxinas de acordo com o tipo de modelo dentário: bovino e humano.
- Avaliar o nível de endotoxina intracanal após os protocolos de desinfecção, mediante o teste de LAL turbidimétrico.

Artigo de Pesquisa 1

Artigo de Pesquisa 1

Can bovine teeth be used as an experimental model for studies on endotoxin contamination?

Submetido à publicação no periódico *Dental Materials*, Qualis A1 e Fator de Impacto 4,160 (Anexo C).

Title: Can bovine teeth be used as an experimental model for studies on endotoxin contamination?

Author names and affiliations: Tiago André Fontoura de Melo DDS, MSc^{ab}; Grasiela Sabrina Longhi Gründling DDS, MSc, PhD^b; Francisco Montagner DDS, MSc, PhD^c; Roberta Kochenborger Scarparo DDS, MSc, PhD^b; José Antônio Poli de Figueiredo DDS, MSc, PhD^b; Fabiana Vieira Vier-Pelisser DDS, MSc, PhD^b.

^a Endodontics Division, Dental School, College of Serra Gaúcha (FSG), Caxias do Sul/RS, Brazil.

^b Clinical Department, Post-Graduate Program, Dental School, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, Brazil.

^c Endodontics Division, Dental School, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil.

Corresponding Author:

Tiago André Fontoura de Melo / Roberta Kochenborger Scarparo

Post-Graduate Program in Dentistry

Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul – PUCRS

Av. Ipiranga 6681 Prédio 6 sala 206

CEP 90619-900 Porto Alegre – RS – Brazil

Telephone: 55 51 3320 3538

E-mail: tafmelo@gmail.com and roberta.scarparo@pucrs.br

Acknowledgments: This study was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS – processo nº. 12/0439-0 / edital nº. 13/2011). The authors deny any conflicts of interest.

ABSTRACT

Introduction: The present study was aimed at looking into the feasibility of using bovine teeth as a replacement for human ones in *in vitro* experiments involving endotoxin contamination. **Materials and Methods:** Twenty bovine central incisors (B), and twenty human single-root pre-molars (H) had their dental crown removed and root length standardized at 16 mm. Root canals were prepared up to #60 hand K-files, and submitted for sterilization by cobalt 60 gama radiation. The teeth of each species were divided randomly into two experimental sub-groups according to the two dental species, positive (P) and negative (N). The canals of the positive groups (HP and BP) were inoculated with *Escherichia coli* (055:B5) LPS. The negative group canals (HN and BN) were just exposed to apyrogenic water. After the teeth had been incubated at 37°C of atmospheric humidity for 24 hours, the samples of the main canal solutions were collected with apyrogenic absorbent paper points. Quantification of the LPS levels was performed by Limulus Ameboesyte Lysate assay. The data obtained were submitted to ANOVA oneway with 5% significance level. **Results:** There was a significant difference ($P < 0,001$) between HN and HP groups and between the two experimental models (bovine and human). However, there was no statistical difference between the BN and BP sub-groups. **Conclusions:** The use of bovine teeth has not shown to be the best choice for laboratory research on endotoxin contamination.

Keywords: Microbial reduction; Endotoxin; Dental pulp cavity; Cattle; Humans; Limulus amoebocyte lysate assay.

INTRODUCTION

The use of human teeth in *in vitro* studies has been less and less frequent due to ethical limitations imposed by the Research Committees, the difficulty in obtaining the right size sample, and the impossibility in obtaining its standardization [1-3]. Thus, animal teeth, such from as pigs [4], rodents [5], and bovines [6] have been increasingly used in studies and, consequently, have become an option for human teeth replacement.

Bovine tooth is a biological material of easy acquisition and handling due to its size [3]. Besides, the age and acquisition of intact bovine teeth can be controlled, becoming an advantage [7]. When compared, human and bovine teeth present few differences with regards to the composition and the tissue structure. Some studies claim that there is similarity in radiodensity [1,8] and in enamel and dentin surface hardness [9]. However, the enamel prisms are higher and harder in the bovine teeth [3]. Regarding the dentin tubules, both human and bovine dentins are similar in dentin tubule number and diameter on the crown portion. Yet, the average dentin tubule diameter in bovine dentin, especially in the root, is bigger than the human one [10,11]. In addition, the thickness of the peritubular dentin is also bigger in bovines [12].

Several studies have successfully used bovine central incisors as a substitute for human teeth, especially in tests for adherence and dental material micro-infiltration [13,14], resistance to fracture and shear bond strength testing [15], and in microbiological tests [16].

However, experiments that assess the presence and the levels of endotoxin in the root canals have generally been carried out using human teeth, either *in vivo* [17,18] or

in vitro [19,20]. So far, there has been no study in the literature regarding contamination by endotoxins in bovine teeth in order to validate this experimental model.

Thus, the present study aims at verifying the feasibility in using bovine teeth rather than human in studies dealing with bacterial lipopolysaccharide (LPS) contamination.

MATERIALS AND METHODS

The present study has been approved by the Ethics and Research Committee of Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS – Protocols numbers 5859 and 811.207).

Sample selection and preparation

Twenty bovine central incisors and twenty human single-root pre-molars teeth were selected and sectioned transversally in order to standardize the root length at 16 mm, and the working length at 15 mm. All the canals were prepared manually using the serial technique up to #60 hand K-files (Dentsply/Maillefer Instruments S.A., Ballaigues, Switzerland), with sodium hypochloride 2% irrigation (Iodontosul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil).

A smear layer of the root canal was removed by using 17% EDTA trisodic (Iodontosul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil), for 5 minutes, shaken with file #60 for one minute. The final irrigation was performed using 2 mL of sodium hypochloride at 2%. The root canals were dried with sterilized paper points (Dentsply/Maillefer Instruments S.A., Ballaigues, Switzerland).

Samples were divided into four groups according to the species (H = human and B = bovine) and presence or absence of LPS contamination (N = negative and P = posi-

tive). All the teeth, n=10 per group, were fixed on culture plates (12 wells, TPP®, Switzerland), using Durepoxi® (Henkel, Düsseldorf, Germany).

The plates with the teeth and the material used in the study were apyrogenized by cobalt 60 gama radiation (20 kGy for 6 hours) (EMBRARAD – Empresa Brasileira de Radiações, Cotia, São Paulo, Brazil), as previously described [21].

Specimen contamination

Sample contamination protocol was performed according to Signoretti et al [22]. The BP and HP teeth groups were inoculated inside a laminar air flow cabinet, with 30 µL of a solution containing *Escherichia coli* O55:B5 endotoxin (Lonza, Walkersville, MD, USA) with the help of a micro-pipette.

The solution containing LPS (80 EU/mL) was previously diluted in apyrogenic water, for use and standardization of the contamination, with approximately 50,37 EU/mL.

In groups BN and HN, the teeth were inoculated with just 30 µL of apyrogenic water.

In all the samples, apyrogenic cotton pellets were placed in the cervical portion of the canals; the plates containing the samples were sealed and incubated at 37°C atmosphere humidity for 24 hours.

Determination of LPS levels

All root canals were filled with 10 µL of apyrogenic water before collection. The material present in the main canal was collected with the help of three #60 absorbent apyrogenic paper points (Dentsply/Maillefer Instruments S.A., Ballaigues, Switzerland)

and maintained in position for 10 seconds. They were then, transferred into glass tubes, sealed and kept at -20°C until quantification of LPS levels was carried out.

With the objective of verifying the accuracy in LPS levels count, quantification of an apyrogenic water sample and paper points used, were previously evaluated.

The glass tubes containing the paper points were filled with 1 mL of apyrogenic water, heated at 37°C for one hour and then centrifuged (Phoenix, Araraquara, São Paulo, Brazil) for one minute.

The kinetic test of turbidimetric *Limulus Amoebocyte Lysate* - LAL (Pyrogen 5000®, BioWhittaker, Cambrex Co, Walkersville, MD, USA) was used in order to quantify LPS levels in the root canals, as already described and applied in some studies [23,24].

The samples collected from the canals were mixed with reagent LAL, and automatically monitored over time with the help of a photometer, until turbidity onset. Increase in optical density is measured by the reaction time, which is inversely proportional to the quantity of LPS present in the sample.

As a parameter for calculating the quantification of LPS levels present in the root canals, a standard curve was drawn using the endotoxin supplied by the kit with known concentration. All the samples collected for the purpose of analysis and quantification were diluted 10 times.

The assays were carried out in duplicate in order to validate the test, and in different wells in a 96 well micro-plate (Corning Costar, Cambridge, MA, USA). For the negative control, 100 µL of apyrogenic water were added, 100 µL standard endotoxin at different concentrations for the curve, and 100 µL of each sample for quantification. Measurement procedures of LPS levels were performed according to the manufacturer's instructions.

The micro-plate was incubated in the enzyme immunoassay reader (Ultramark, Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, CA, USA), at $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ for 10 minutes, coupled to a computer with Wink QCL version 4 (BioWittaker, Cambrex CO, Walkersville, MD, EUA) software.

After the incubation period, 100 μL of LAL kinetic reagent (Sigma Chemical Company St Louis, USA) were added to each well, thus starting the reading and quantification of LPS levels.

Statistical analysis

EU/mL measures received logarithmic transformations in order to reduce asymmetry and heterocedasticity. The data were described by means of geometric mean and maximum and minimum values. The comparison between groups was carried out with one-way variance analysis (ANOVA oneway) on the logarithms, followed by Tukey post hoc. Significance level was 5% ($P \leq 0,05$).

RESULTS

In order to validate the turbidimetric LAL assay, the standard curve followed the linearity criteria ($r=1$).

Endotoxin contamination levels ($< 0,0100$ EU/mL) were not detected in the material used (apyrogenic water and absorbent paper tips) during the collection process.

The results of the analysis of the experimental groups are shown in Figure 01. There was a significant difference ($P < 0,001$) between the negative and positive control groups for human teeth, and between the two experimental models (bovine and human). Yet, there was no statistical difference in the comparison of the two sub-groups, formed by bovine teeth (BN and BP).

DISCUSSION

Studies on the action of chemicals, intra-canal medications, and new technologies have been more and more frequent when the possibility of inactivation and elimination of bacterial LPS inside the root canal system is discussed.

LPS is an immunological mediator released during bacteria multiplication and death, extremely important in apical periodontitis pathogenesis, which besides the harmful biological effects, is capable of penetrating four times as deeper as the bacterium itself inside the dentin tubules [25]. Thus, when carrying out studies on bacterial LPS, the most reliable experimental medium to the endodontic needs, which is the root canal system itself, must be used. Nowadays, the most widely used experimental model in this kind of study is the human tooth [17-20], which, nevertheless, presents some limitations and difficulties regarding its use. Studies with endotoxin in other animal models, such as dogs, have been carried out [26]; however, approval and authorization for its use has been increasingly difficult. Thus, the use of bovine teeth appears as a possible human substitute. Nevertheless, it is first necessary to know whether the experimental model with bovine teeth is a feasible alternative for studies on endotoxin quantification.

The use of root canal *in vitro*, whether human or bovine, in studies with previous contamination and quantification of bacterial LPS levels, present some advantages in relation to the *in vivo* model, such as in obtaining canal apyrogenization, during the baseline period of tooth preparation, and then introducing the endotoxin - of EU/mL standard and approximate value - inside all the samples used in the research. So, depending on the objective to be analyzed, a bias must be avoided in the methodology applied.

Nowadays, the approach used in most studies [17-20] to make dental pieces apyrogenic for endoxins, is using Cobalt 60 gama radiation.

Thus, the materials and the teeth used in this study have undergone sterilization by Cobalt 60 radiation in order to eliminate pre-existent endotoxins [27,28]. According to information supplied by EMBRARAD, the sterilization process and decontamination by ionized energy consist in exposing the products to electromagnetic short waves generated from sealed sources of Cobalt 60. When those waves meet the live organisms present in the product under treatment, they cause DNA rupture, leading them to failure or reproduction incapacity. Due to the high penetration power of the electromagnetic waves, the live organisms can be reached wherever they are, be it in sealed packaging or in products packaged in the most varied ways. However, the protocol used in this study was not effective on bovine teeth. It was observed that the negative control group (BN) did not present any statistical difference in relation to the positive group (BP) previously contaminated by endotoxins. There was even a tendency to potentiate LPS levels in the positive group, possibly due to the death of the bacteria already present in the canal, or the identification of endotoxins already present. It might be necessary to test different disinfection protocols, with different radiation doses (kGy), in order to make the bovine dental pieces apyrogenic. However, it is necessary to take into account that, according to Soares et al [29], the higher the radiation power the higher the possibility of damage to the dentin structure, such as occurrence of cracks, especially on the peritubular dentin, which can compromise the use of that sample in certain kinds of experiments.

Yet, the results obtained from human teeth (HN and HP groups) are in accordance with the results obtained in several studies, such as Oliveira et al [30], Maekawa et al [31] and Signoretti et al [22], who used the same apyrogenization protocol from the human sample, attaining decontamination in the negative control group.

With regards to the possibility of a pre-existent contamination in the bovine teeth, some studies have observed an association of *Escherichia coli* O157:H7 and its

endotoxins with cattle and bovine by-products, making researchers look for ways to solve this zoonosis by means of specific slaughtering practices and carcass decontamination [32-34]. Many factors can affect contamination, such as age [35,36], season of the year [37], diet [38], animal stress when slaughtered [39] and confinement environment [40]. So, the dental carcass chosen at slaughter and used in the study might have already been contaminated. However, even if the dental sample had been contaminated during handling, the results obtained in the negative control group are not justified, especially due to the fact that the pieces had been apyrogenized before being used. The sterilization process used - 60 Cobalt radiation – should have the same efficacy as in the human teeth apyrogenization. Some gram microbial species, which might be present in the bovine tooth, may not have undergone lethal power with the radiation dose applied in the study.

Therefore, according to the results obtained in the present study, we believe that the use of bovine teeth has not shown to be an ideal option of experimental model for laboratory research with bacterial LPS, until an efficient decontamination protocol is obtained. Further studies must be carried out with the aim of elucidating and searching for an ideal protocol for preparation and pyrogenization of this dental specimen before contraindicating its use.

REFERENCES

- [1] R.B. Fonseca, F. Haiter-Neto, A.J. Fernandes-Neto, G.A. Barbosa, C.J. Soares, Radiodensity of enamel and dentin of human, bovine and swine teeth. *Arch. Oral. Biol.* 49 (2004) 919-22.
- [2] A.F. Reis, M. Giannini, A. Kavaguchi, C.J. Soares, S.R. Line, Comparison of microtensile bond strength to enamel and dentin of human, bovine, and porcine teeth. *J. Adhes. Dent.* 6 (2004) 117-21.

- [3] K.G. Almeida, K.G. Scheibe, A.E. Oliveira, C.M. Alves, J.F. Costa, Influence of human and bovine substrate on the microleakage of two adhesive systems. *J. Appl. Oral. Sci.* 17 (2009) 92-6.
- [4] A. Abuabara, A.J.S. Santos, F.H.B. Aguiar, J.R. Lovadino, Evaluation of microleakage in human, bovine and swine enamels. *Braz. Oral. Res.* 18 (2004) 312-6.
- [5] R.K. Scarparo, L. Dondoni, D.E. Böttcher, F.S. Grecca, J.A. Figueiredo, A. Kantarci, T.E. Van Dyke, E.L. Batista Júnior, Intracanal Delivery of Resolvin E1 Controls Inflammation in Necrotic Immature Rat Teeth. *J. Endod.* 40 (2014) 678-82.
- [6] M. Brito-Júnior, R.D. Pereira, C. Veríssimo, C.J. Soares, A.L. Faria-E-Silva, C.C. Camilo, M.D. Sousa-Neto, Fracture resistance and stress distribution of simulated immature teeth after apexification with mineral trioxide aggregate. *Int. Endod. J.* 47 (2014) 1-9.
- [7] A.D. Wilder Júnior, E.J. Swift Júnior, K.N. May Júnior, S.L. Waddell, Bond strengths of conventional and simplified bonding systems. *Am. J. Dent.* 11 (1998) 114-7.
- [8] R.B. Fonseca, F. Haiter-Neto, H.L. Carlo, C.J. Soares, M.A. Sinhoreti, R.M. Puppini-Rontani, L. Correr-Sobrinho, Radiodensity and hardness of enamel and dentin of human and bovine teeth, varying bovine teeth age. *Arch. Oral. Biol.* 53 (2008) 1023-9.
- [9] T.A. Donassollo, A.R. Romano, F.F. Demarco, I. Della-Bona, Surface microhardness evaluation of enamel and dentin in bovine and human teeth (permanent and deciduous). *Rev. Odonto. Ciênc.* 22 (2007) 311-6.
- [10] R. Schilke, J.A. Lisson, O. Bauss, W. Geurtsen, Comparison of the number and diameter of dentinal tubules in human and bovine dentine by scanning electron microscopic investigation. *Arch. Oral. Biol.* 45 (2000) 355-61.
- [11] C.H. Camargo, M. Siviero, S.E. Camargo, S.H. de Oliveira, C.A. Carvalho, M.C. Valera, Topographical, diametral, and quantitative analysis of dentin tubules in the root canals of human and bovine teeth. *J. Endod.* 33 (2007) 422-6.
- [12] M. Dutra-Correa, C. Anauate-Netto, V.E. Arana-Chavez, Density and diameter of dentinal tubules in etched and non-etched bovine dentine examined by scanning electron microscopy. *Arch. Oral. Biol.* 52 (2007) 850-5.
- [13] L.M. Firoozmand, J.V. Brandão, M.P. Fialho, Influence of microhybrid resin and etching times on bleached enamel for the bonding of ceramic brackets. *Braz. Oral. Res.* 27 (2013) 142-8.
- [14] M. Giorgi, N. Hernandez, M. Sugii, G. Ambrosano, G. Marchi, D. Lima, F. Aguiar, Influence of an Intermediary Base on the Microleakage of Simulated Class II Composite Resin Restorations. *Oper. Dent.* 39 (2014) 301-7.
- [15] R.A. Rosa, M.S. Barreto, T.A. da Rosa, K.R. Reis, O.B. Kaizer, Fracture resistance of weakened teeth restored using accessory glass fiber posts. *Gen. Dent.* 61 (2013) 45-9.

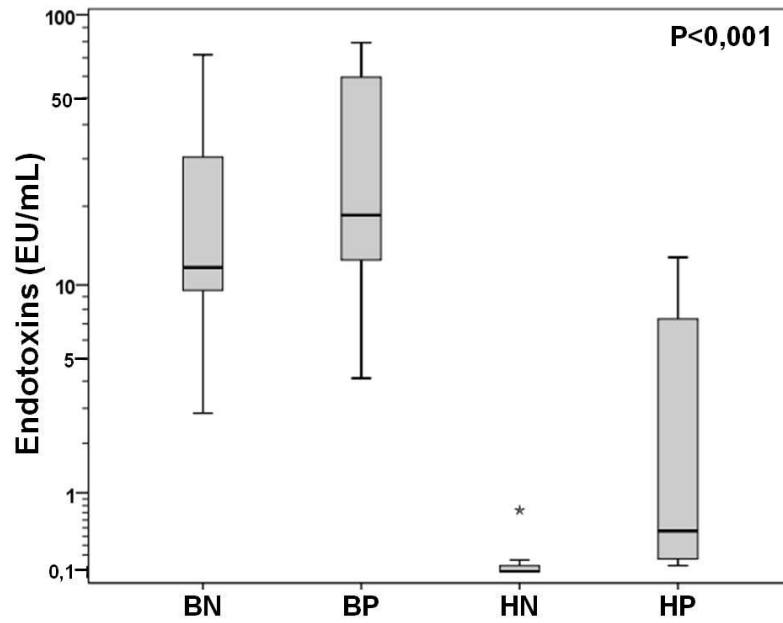
- [16] G.L. Gründling, J.G. Zechin, W.M. Jardim, S.D. de Oliveira, J.A. Figueiredo, Effect of ultrasonics on *Enterococcus faecalis* biofilm in a bovine tooth model. *J. Endod.* 37 (2011) 1128-33.
- [17] F.C. Martinho, A.P. Gomes, A.M. Fernandes, N.S. Ferreira, M.S. Endo, L.F. Freitas, I.C. Camões, Clinical comparison of the effectiveness of single-file reciprocating systems and rotary systems for removal of endotoxins and cultivable bacteria from primarily infected root canals. *J. Endod.* 40 (2014) 625-9
- [18] E.L. Sousa, F.C. Martinho, G.G. Nascimento, F.R. Leite, B.P. Gomes, Quantification of endotoxins in infected root canals and acute apical abscess exudates: monitoring the effectiveness of root canal procedures in the reduction of endotoxins. *J. Endod.* 40 (2014) 177-81.
- [19] J.R. Archilla, M.S. Moreira, S.P. Miyagi, A.C. Bombana, N. Gutknecht, M.M. Marques, Single session of Nd:YAG laser intracanal irradiation neutralizes endotoxin in dental root dentin. *J. Biomed. Opt.* 17 (2012) 1-5.
- [20] A.C. Marinho, F.C. Martinho, A.A. Zaia, C.C. Ferraz, B.P. Gomes, Influence of the apical enlargement size on the endotoxin level reduction of dental root canals. *J. Appl. Oral. Sci.* 20 (2012) 661-6.
- [21] L.D. Oliveira, C.A. Carvalho, A.S. Carvalho, J.S. Alves, M.C. Valera, A.O. Jorge, Efficacy of endodontic treatment for endotoxin reduction in primarily infected root canals and evaluation of cytotoxic effects. *J. Endod.* 38 (2012) 1053-7.
- [22] F.G.C. Signoretti, B.P. Gomes, F. Montagner, F. Barrichello Tosello, R.C. Jacinto, 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.* 111 (2011) 653-8.
- [23] F.C. Martinho, W.M. Chiesa, A.A. Zaia, C.C. Ferraz, J.F. Almeida, F.J. Souza Filho, B.P. Gomes, Comparison of endotoxin levels in previous studies on primary endodontic infections. *J. Endod.* 37 (2011) 163-7.
- [24] A.C. Xavier, F.C. Martinho, A. Chung, L.D. Oliveira, A.O. Jorge, M.C. Valera, C.A. Carvalho, One-visit versus two-visit root canal treatment: effectiveness in the removal of endotoxins and cultivable bacteria. *J. Endod.* 39 (2013) 959-64.
- [25] B.P. Gomes, F.C. Martinho, M.E. Vianna, Comparison of 2.5% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine gel on oral bacterial lipopolysaccharide reduction from primarily infected root canals. *J. Endod.* 35 (2009) 1350-3.
- [26] J.M. Tanomaru, M.R. Leonardo, M. Tanomaru Filho, I. Bonetti Filho, L.A. Silva, Effect of different irrigation solutions and calcium hydroxide on bacterial LPS. *Int. Endod. J.* 36 (2003) 733-9.
- [27] K. Tsuji, S.J. Harrison, *Limulus* amoebocyte lysate - a means to monitor inactivation of lipopolysaccharide. *Prog. Clin. Biol. Res.* 29 (1979) 367-78.

- [28] G. Czako, R.J. Elin, D. Hochstein, C.M. Tsai, Physical and biological properties of US standard endotoxin EC after exposure to ionizing radiation. *Infection and Immunity*. 41 (1983) 190-6.
- [29] C.J. Soares, C.G. Castro, N.A. Neiva, P.V. Soares, P.C. Santos-Filho, L.Z. Naves, P.N. Pereira, Effect of gamma irradiation on ultimate tensile strength of enamel and dentin. *J. Dent. Res.* 89 (2010) 159-64.
- [30] L.D. Oliveira, A.O. Jorge, C.A. Carvalho, C.Y. Koga-Ito, M.C. Valera, In vitro effects of endodontic irrigants on endotoxins in root canals. *Oral. Surg. Oral. Med. Oral. Pathol. Oral. Radiol. Endod.* 104 (2007) 135-42.
- [31] L.E. Maekawa, M.C. Valera, L.D. Oliveira, C.A. Carvalho, C.Y. Koga-Ito, A.O. Jorge, In vitro evaluation of the action of irrigating solutions associated with intracanal medications on *Escherichia coli* and its endotoxin in root canals. *J. Appl. Oral. Sci.* 19 (2011) 106-12.
- [32] A. Castillo, L.M. Lucia, K.J. Goodson, J.W. Savell, G.R. Acuff, Decontamination of beef carcass surface tissue by steam vacuuming alone and combined with hot water and lactic acid sprays. *J. Food. Prot.* 62 (1999) 146-51.
- [33] E.D. Berry, C.N. Cutter, Effects of acid adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 on efficacy of acetic acid spray washes to decontaminate beef carcass tissue. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (2000) 1493-8.
- [34] D.H. Kang, M. Koochmaraie, W.J. Dorsa, G.R. Siragusa, Development of a multiple-step process for the microbial decontamination of beef trim. *J. Food. Prot.* 64 (2001) 63-71.
- [35] W.C. Cray, H.W. Moon, Experimental infection of calves and adult cattle with *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Environ. Microbiol.* 61 (1995) 1586-90.
- [36] E.M. Nielsen, C. Tegtmeier, H.J. Andersen, C. Gronbaek, J.S. Andersen, Influence of age, sex and herd characteristics on the occurrence of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in Danish dairy farms. *Vet. Microbiol.* 88 (2002) 245-57.
- [37] D.D. Hancock, T.E. Besser, D.H. Rice, D.E. Herriott, P.I. Tarr, A longitudinal study of *Escherichia coli* O157 in fourteen cattle herds. *Epidemiol. Infect.* 118 (1997) 193-5.
- [38] F. Diez-Gonzalez, T.R. Callaway, M.G. Kizoulis, J.B. Russell, Grain feeding and the dissemination of acid-resistant *Escherichia coli* from cattle. *Science*. 281 (1998) 1666-8.
- [39] W.C. Cray, T.A. Casey, B.T. Bosworth, M.A. Rasmussen, Effect of dietary stress on fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in calves. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (1998) 1975-9.

[40] J.A. Shere, K.J. Bartlett, C.W. Kaspar, Longitudinal study of *Escherichia coli* O157:H7 dissemination on four dairy farms in Wisconsin. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (1998) 1390-9.

FIGURE LEGEND

Figure 01 – Each experimental group boxplot distribution of the endotoxin concentration in EU/mL.



Artigo de Pesquisa 2

Artigo de Pesquisa 2

Quantification of lipopolysaccharide (LPS) levels in root canal infection after the use of ozone gas and high frequency electrical pulses

Submetido à publicação no periódico *Journal of Endodontics*, Qualis A1 e Fator de Impacto 2,788 (Anexo D).

Title: Quantification of lipopolysaccharide (LPS) levels in root canal infection after the use of ozone gas and high frequency electrical pulses

Author names and affiliations: Tiago André Fontoura de Melo DDS, MSc^{ab}; Grasiela Sabrina Longhi Gründling DDS, MSc, PhD^b; Francisco Montagner DDS, MSc, PhD^c; Alcione Luiz Scur DDS, MSc^d; Liviu Steier DDS, MSc, PhD^e; Roberta Kochenborger Scarparo DDS, MSc, PhD^b; José Antônio Poli de Figueiredo DDS, MSc, PhD^b; Fabiana Vieira Vier-Pelisser DDS, MSc, PhD^b.

^a Endodontics Division, Dental School, College of Serra Gaúcha (FSG), Caxias do Sul/RS, Brazil.

^b Clinical Department, Post-Graduate Program, Dental School, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, Brazil.

^c Endodontics Division, Dental School, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil.

^d Private Practice, Gramado, Brazil.

^e Postgraduate Dental Education Unit, Institute of Clinical Education, Warwick Medical School, University of Warwick, Coventry, UK.

Corresponding Author:

Tiago André Fontoura de Melo / Roberta Kochenborger Scarparo

Post-Graduate Program in Dentistry

Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul – PUCRS

Av. Ipiranga 6681 Prédio 6 sala 206

CEP 90619-900 Porto Alegre – RS – Brazil

Telephone: 55 51 3320 3538

E-mail: tafmelo@gmail.com and roberta.scarparo@pucrs.br

Acknowledgments: This study was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS – processo nº. 12/0439-0 / edital nº. 13/2011). The authors deny any conflicts of interest related to this study.

ABSTRACT

Introduction: The present study is aimed at verifying the effect of ozone gas (OZY® System) and high frequency electric pulses (Endox® System) systems in human root canals previously contaminated with *Escherichia coli* lipopolysaccharide (LPS). **Methods:** Fifty single-rooted teeth had their dental crowns removed and root length standardized at 16 mm. The root canals were prepared up to #60 hand K-files, and submitted to sterilization by gama radiation with cobalt 60. The specimens were divided into five groups (n=10), according to the disinfection protocol: OZY® System, one 120-second-pulse (OZY 1p); OZY® System, four 24-second-pulses (OZY 4p); Endox® System (ENDOX). Contaminated and non-contaminated canals, exposed only to apyrogenic water, were used as positive (C+) and negative (C-) controls, respectively. The LPS (O55:B5) was inoculated into the root canals, except in group C- teeth. After performing the disinfection protocols, LPS samples were collected from the canals using apyrogenic paper points. Quantification of LPS levels was performed by Limulus Amoebocyte Lysate (LAL). The data obtained were submitted to oneway ANOVA with 5% significance level. **Results:** The disinfection protocols used were unable to reduce the LPS levels significantly. **Conclusions:** The use of ozone gas and high frequency electric pulses was not effective in the elimination of LPS in root canals.

Keywords: endodontics, microbiology, root canal therapy, endotoxins, ozone, high frequency electrical pulses.

INTRODUCTION

Microorganisms and their by products, such as bacterial LPS (endotoxin), play a key role in the development of apical periodontitis (1-4). LPS is released during multiplication or death of gram-negative bacteria, being associated with countless biologic effects, such as release of pro-inflammatory mediators (5-7) and induction of periapical bone resorption process (8, 9). The endoxins can adhere to mineralized tissues (10) and disseminate through the dental tubules (11), which makes the process of root canal sanitizing difficult if just the chemomechanical preparation is used (12, 13). The effects of different disinfection strategies (14-18) on LPS have already been accessed, yet, none has been fully effective.

Electrofulguration and ozone gas equipment were tested for microorganisms, with satisfactory results (19-21). Electrofulguration system, such as Endox®, takes place through electrical pulses delivered inside the root canal by using a stainless steel surgical needle that works as an active electrode (19), eliminating the organic and inorganic content through steaming (22). Yet, ozone is a very reactive gas which has oxidation power on the cell walls and on the cytoplasmic membrane of the microorganisms (21).

So far there have been no studies regarding the effects of this equipment on the LPS. Thus, the objective of the present study was to assess in vitro the effect of ozone gas and high frequency electrical pulses on LPS levels in infected root canals.

METHODS

The present study has been approved by the Ethics and Research Committee of Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS – Protocols numbers 5859 and 811.207).

All the plates and the materials used in the study were sterilized by cobalt 60 gama radiation (20 kGy for 6 hours) (EMBRARAD – Empresa Brasileira de Radiações, Cotia, São Paulo, Brazil), as previously described (2).

Sample selection and preparation

Fifty single-root premolars had their dental crowns sectioned in such a way that the the root length were standardized at 16 mm. A 15 mm working length (WL) was established. The canals were handly prepared using the serial technique up to #60 hand K-files (Dentsply/Maillefer Instruments S.A., Ballaigues, Switzerland), under irrigation of sodium hypochlorite at 2% (Iodontosul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil).

The smear layer was removed by using 17% EDTA trisodic (Iodontosul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil) for 5 minutes, which was agitated in the root canal with aid of a #60 hand K-file for one minute. The final irrigation was performed using 2 mL of sodium hypochlorite at 2%. The root canals were dried by using sterilized paper points (Dentsply/Maillefer Instruments S.A., Ballaigues, Switzerland).

The teeth were randomly fixed in 12 wells culture plates (Kasvi, Curitiba, Paraná, Brazil) with Durepoxi® (Henkel, Düsseldorf, Germany). In each plate there were two teeth from each one of the 5 experimental groups (Table 1).

Specimen contamination

This protocol was performed according to Signoretti et al (23). The teeth were inoculated inside a laminar flow chamber by 30 μ L of a solution containing the endotoxin *Escherichia coli* O55:B5 (Lonza, Walkersville, MD, USA) with the aid of a micro pipette.

The solution containing LPS (80 EU/mL), previously diluted in apyrogenic water (50.37 EU/mL), was used to promote the specimens contamination, except for the teeth, in group C-, which were inoculated with 30 μ L of apyrogenic water.

Apyrogenic cotton pellets were placed in the cervical portion of the canals in all the samples. The plates containing the samples were sealed and incubated for 24 hours at 37°C air humidity.

Disinfection Procedure

Prior to performing the protocols, all root canals were filled with 10 μ L of apyrogenic water. Disinfection protocols performed in each experimental group were:

- Group C+: the LPS contaminated canals did not undergo any disinfection protocol.
- Group C-: the canals with no previous LPS inoculations, did not undergo any disinfection protocol.
- Group OZY 1p: the tip of the OZY® system was introduced into the working length of the root canal; just one 120-second-long pulse was delivered, as described by Kustarsi et al (20).
- Group OZY 4p: the OZY® system was introduced into the working length of the root canals, and four 24-second pulses each were delivered, according to Case et al (21). There was a 5 second interval between pulses.

Due to the unavailability of a specific tip to use with the OZY® system (Endox SRL, Italy) in endodontics, an adapter was developed for the already available “Oto” tip. This adapter was made of 420 surgical steel with 0.20 mm diameter at the end and 30 mm length (Figure 01).

The OZY® system was operated with 5 N intensity, in accordance to the manufacturer. The only variation was in the device activation time between the OZY 1p and OZY 4p groups.

- Group ENDOX: the protocol for the use of Endox® system (Lysis srl, Milan, Italy) used in the experiment was the same as described by Lendini et al (22). The device black probe (measuring 30 mm in length and 0.20 mm in diameter) was introduced into the root canal. Two pulses were carried out in the medium third of the root canal (5 mm short of the WL), and other two pulses in the apical third (in the WL). A total of four 600 kHz pulses were delivered with a 1/10 of a second standard time for each application.

Determination of LPS Levels

The canals content was collected using three apyrogenic #60 paper points (Dentsply/Maillefer Instruments S.A., Ballaigues, Switzerland), kept in position for 10 seconds. They were then transferred into glass tubes, sealed and kept at -20°C until LPS levels quantification was carried out.

With the purpose of checking the accuracy in the LPS levels counting, quantification of an apyrogenic water sample and of the paper points used, were previously assessed.

The glass tubes containing the paper points were filled with 1 mL apyrogenic water, warmed at 37°C for one hour, and finally centrifuged (Phoenix, Araraquara, São Paulo, Brazil) for one minute.

The kinetic test of the turbidimetric LAL (Pyrogen 5000®, BioWhittaker, Cambrex Co, Walkersville, MD, USA) was used to quantify the LPS levels in the root canals, as already described and applied in some studies (2, 16).

The samples collected from the canals were mixed with the LAL reagent and automatically monitored over time with the help of a photometer until turbidity developed. The increase in optical density is measured by the reaction time that is inversely proportional to the amount of LPS present in the sample.

As a parameter for calculating the quantification of LPS levels present in the root canals a curve was drawn using the endotoxin supplied by the kit with known concentration. All the samples collected for analysis and quantification were diluted ten times.

The assays were carried out twice for test validation, in distinct wells in a 96-well microplate (Corning Costar, Cambridge, MA, USA). One hundred µL apyrogenic water were added for the negative control, 100 µL standard endotoxin at different concentrations for the curve, and 100 µL from each sample for quantification. The procedures for LPS levels measurement were performed according to the manufacturers' instructions.

The microplate was incubated in enzyme immunoassay reader (Ultramark, Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, CA, USA), for 10 minutes at 37±1°C; the reader was coupled to a computer with Wink QCL software version 4 (BioWhittaker, Cambrex CO, Walkersville, MD, EUA).

After incubation 100 μ L of LAL kinetic reagent (Sigma Chemical Company St Louis, USA) were added to each plate well, thus starting reading and quantification of LPS levels.

Statistical analysis

EU/mL measures received logarithmic transformations in order to reduce asymmetry and heterocedasticity. The data were described by means of geometric mean and maximum and minimum values. The comparison between groups was carried out with one-way variance analysis (ANOVA oneway) on the logarithms. Significance level was 5% ($P \leq 0,05$).

RESULTS

The standard curve followed the linearity criteria ($r=1$) for LAL assay validation. LAL assay showed that LPS was present in 100% of the root canals initially contaminated.

Results are shown in Figure 02. There was no significant difference in the reduction of endotoxin in the experimental groups, to which the disinfection protocols were applied, in relation to group C+. The endotoxin concentration in the group C- specimens presented statistical difference when compared with the other groups analyzed.

DISCUSSION

Success in the endodontic treatment of infected teeth should not focus only on the elimination of microorganisms, but also on the inactivation of endotoxins and other toxic products (2, 3). Thus, in face of the results observed using the ozone gas system

(21, 24) and high frequency electrical pulses (19) on microbial strains, analysis of those systems on bacterial LPS was also thought to be pertinent.

The endotoxin used in the present study was obtained from *Escherichia coli*, as it is the standard endotoxin employed in most research studies (14, 25). As a quantification method of the LPS levels, LAL assay was used due to its extreme sensitivity to measurement (2, 15).

The turbidimetric LAL assay indicated that the endotoxins were present in all the previously contaminated samples, with concentrations ranging from 0,1 to 12,8 EU/mL in the positive control group. That variation is in accordance with Jacinto et al (26) who have found endotoxin concentrations between 2,3 to 22,1 EU/mL. This range in values can be attributed to the test sensitivity, which detects slight variations, and to the difference in the dental anatomy between species. Besides, the LPS concentration obtained was inferior to the approximate value of 50,37 EU/mL injected into each root canal. This can be justified as the samples were collected from the main canal and not deep enough next to the dentine tubules region. According to Horiba et al (11), especially due to its low molecular weight, the endotoxin is able to penetrate into the dentinal tubules four times deeper than the microorganisms reaching 800 μm in depth. Thus, the use of auxiliary strategies to mechanical instrumentation is essential for the root canal system disinfection.

None of the protocols performed herein promoted significant reduction in the endotoxin levels, in relation to the positive control group. This can be justified by the fact that the two systems tested have presented, as the principle of anti-microbial action (19, 21), damage to the structure of the microbial coating. As LPS does not present coating structure, and because it is a structure composed of specific polysaccharide O, a central nucleus and a lipid component A (27), it does not suffer any effective action

from those systems. This can be supported the study of Cardoso et al (28), where ionized water was not able to neutralize the root canal endotoxins. The results have shown the presence of endotoxins both in the ozone water group and in the saline solution control group. Another factor that could have corroborated for the result obtained in this study is the ephemeral ozone gas half-life (29). The only supporting resources that have been tested so far and shown certain degree of effectiveness on LPS were the use of calcium hydroxide as intra-canal medication (14), which has hydrolysis power of the lipid A component, changing it into chains of fatty acid and nontoxic sugars (30), as well as the application of laser Nd:YAG (17).

The results obtained in the study reinforce the importance of the association of instrumentation mechanical act to any disinfection protocol (16, 31, 32, 33), especially with regards to the bacterial LPS that strongly adheres to the dentinal wall (10), being necessary the use of an endodontic instrument for its removal. Some studies have reported endotoxin decrease, after the chemomechanical preparation, as 44,4% (34), 59,99% (33) and 57,98% (15).

Martinho et al (16) noticed 98,06% decrease in the endotoxin after performing canal preparation with NiTi (Mtwo®) rotatory tools, under irrigation with sodium hypochlorite solution at 2,5%, and 96,27% decrease when the rotatory preparation was associated with irrigation using apyrogenic saline solution. According to the authors, a basic factor that must be taken into account when performing chemomechanical preparation in order to obtain some decrease in bacterial LPS, is the enlargement of the apical third. Enlargements over size 30 instruments are recommended not only for removing endotoxin but also more infected dentin. Furthermore, that approach allows for a deeper irrigation process and contributes for greater probability of opening secondary canals and apical deltas. However, Martinho et al (31) oppose such assertion as they have tested

different systems with different designs, conicities and tapers, such as WaveOne®, Reciproc®, Protaper® and Mtwo® and have not observed any statistical difference in the decrease of bacterial LPS. The percentages obtained regarding LPS decrease were 95,15%, 96,21%, 97,98% and 96,34% to each system, respectively.

Thus, and according to the results of this study, the need of further studies associating the use of that equipment to the chemomechanical preparation is evident, especially because of the known complexity of the root canal system, and for the search of a 100% efficient endodontic treatment method or system, able to eliminate bacterial LPS, which is yet to be found.

REFERENCES

1. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1965;20:340-9.
2. Martinho FC, Chiesa WM, Zaia AA, Ferraz CC, Almeida JF, Souza-Filho FJ, Gomes BP. Comparison of endotoxin levels in previous studies on primary endodontic infections. *J Endod* 2011;37:163-7.
3. Oliveira LD, Carvalho CA, Carvalho AS, Alves JS, Valera MC, Jorge AO. Efficacy of endodontic treatment for endotoxin reduction in primarily infected root canals and evaluation of cytotoxic effects. *J Endod* 2012;38:1053-7.
4. Sousa EL, Martinho FC, Nascimento GG, Leite FR, Gomes BP. Quantification of endotoxins in infected root canals and acute apical abscess exudates: monitoring the effectiveness of root canal procedures in the reduction of endotoxins. *J Endod* 2014;40:177-81.
5. Lin SK, Wang CC, Huang S, Lee JJ, Chiang CP, Lan WH, Hong CY. Induction of dental pulp fibroblast matrix metalloproteinase-1 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 gene expression by interleukin-1alpha and tumor necrosis factor-alpha through a prostaglandin-dependent pathway. *J Endod* 2001;27:185-9.
6. Martinho FC, Chiesa WM, Leite FR, Cirelli JA, Gomes BP. Antigenic activity of bacterial endodontic contents from primary root canal infection with periapical lesions against macrophage in the release of interleukin-1beta and tumor necrosis factor alpha. *J Endod* 2010;36:1467-74.

7. Martinho FC, Chiesa WM, Leite FR, Cirelli JA, Gomes BP. Antigenicity of primary endodontic infection against macrophages by the levels of PGE(2) production. *J Endod* 2011;37:602-7.
8. Hong CY, Lin SK, Kok SH, Cheng SJ, Lee MS, Wang TM, Chen CS, Lin LD, Wang JS. The role of lipopolysaccharide in infectious bone resorption of periapical lesion. *J Oral Pathol Med* 2004;33:162-9.
9. Williamson AE, Dawson DV, Drake DR, Walton RE, Rivera EM. Effect of root canal filling/sealer systems on apical endotoxin penetration: a coronal leakage evaluation. *J Endod* 2005;31:599-604.
10. Barthel CR, Levin LG, Reisner HM, Trope M. TNF-alpha release in monocytes after exposure to calcium hydroxide treated Escherichia coli LPS. *Int Endod J* 1997;30:155-9.
11. Horiba N, Maekawa Y, Matsumoto T, Nakamura H. A study of the distribution of endotoxin in the dentinal wall of infected root canals. *J Endod* 1990;16:331-4.
12. Byström A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. *Scand J Dent Res* 1981;89:321-8.
13. Siqueira JF Jr, Lima KC, Magalhães FA, Lopes HP, de Uzeda M. Mechanical reduction of the bacterial population in the root canal by three instrumentation techniques. *J Endod* 1999;25:332-5.
14. Silva L, Nelson-Filho P, Leonardo MR, Rossi MA, Pansani CA. Effect of calcium hydroxide on bacterial endotoxin in vivo. *J Endod* 2002;28:94-8.
15. Gomes BP, Martinho FC, Vianna ME. Comparison of 2.5% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine gel on oral bacterial lipopolysaccharide reduction from primarily infected root canals. *J Endod* 2009;35:1350-3.
16. Martinho FC, Chiesa WM, Marinho AC, Zaia AA, Ferraz CC, Almeida JF, Souza-Filho FJ, Gomes BP. Clinical investigation of the efficacy of chemomechanical preparation with rotary nickel-titanium files for removal of endotoxin from primarily infected root canals. *J Endod* 2010;36:1766-9.
17. Archilla JR, Moreira MS, Miyagi SP, Bombana AC, Gutknecht N, Marques MM. Single session of Nd:YAG laser intracanal irradiation neutralizes endotoxin in dental root dentin. *J Biomed Opt* 2012;17:1-5.
18. Xavier AC, Martinho FC, Chung A, Oliveira LD, Jorge AO, Valera MC, Carvalho CA. One-visit versus two-visit root canal treatment: effectiveness in the removal of endotoxins and cultivable bacteria. *J Endod* 2013;39:959-64.
19. Cassanelli C, Marchese A, Cagnacci S, Debbia EA. Alteration of membrane permeability of bacteria and yeast by high frequency alternating current (HFAC). *Open Microbiol J* 2008;2:32-7.

20. Kuştarci A, Sümer Z, Altunbaş D, Koşum S. Bactericidal effect of KTP laser irradiation against *Enterococcus faecalis* compared with gaseous ozone: an ex vivo study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009;107:73-9.
21. Case PD, Bird PS, Kahler WA, George R, Walsh LJ. Treatment of root canal biofilms of *Enterococcus faecalis* with ozone gas and passive ultrasound activation. *J Endod* 2012;38:523-6.
22. Lendini M, Alemanno E, Migliaretti G, Berutti E. The effect of high-frequency electrical pulses on organic tissue in root canals. *Int Endod J* 2005;38:531-8.
23. Signoretti FGC, Gomes BP, Montagner F, Barrichello Tosello F, Jacinto RC. Influence of 2% chlorhexidine gel on calcium hydroxide ionic dissociation and its ability of reducing endotoxin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2011;111:653-8.
24. Halbauer K, Prskalo K, Jankovic B, Tarle Z, Panduric V, Kalenic S. Efficacy of ozone on microorganisms in the tooth root canal. *Coll Antropol* 2013;37:101-7.
25. Oliveira LD, Carvalho CAT, Valera MC, Koga-Ito CY, Jorge AOC. Diffusion ability of endotoxin through dentinal tubules. *Braz Oral Res* 2005;19:5-10.
26. Jacinto RC, Gomes BP, Shah HN, Ferraz CC, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Quantification of endotoxins in necrotic root canals from symptomatic and asymptomatic teeth. *J Med Microbiol* 2005;54:777-83.
27. Mohammadi Z. Endotoxin in endodontic infections: a review. *J Calif Dent Assoc* 2011;39:152-5.
28. Cardoso MG, Oliveira LD, Koga-Ito CY, Jorge AO. Effectiveness of ozonated water on *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, and endotoxins in root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008;105:85-91.
29. Farac RV, Pizzolitto AC, Tanomaru JM, Morgental RD, Lima RK, Bonetti-Filho I. Ex-vivo effect of intracanal medications based on ozone and calcium hydroxide in root canals contaminated with *Enterococcus faecalis*. *Braz Dent J* 2013;24:103-6.
30. Safavi KE, Nichols FC. Effect of calcium hydroxide on bacterial lipopolysaccharide. *J Endod* 1993;19:76-8.
31. Martinho FC, Gomes AP, Fernandes AM, Ferreira NS, Endo MS, Freitas LF, Camões IC. Clinical comparison of the effectiveness of single-file reciprocating systems and rotary systems for removal of endotoxins and cultivable bacteria from primarily infected root canals. *J Endod* 2014;40:625-9.
32. Marinho AC, Martinho FC, Zaia AA, Ferraz CC, Gomes BP. Influence of the apical enlargement size on the endotoxin level reduction of dental root canals. *J Appl Oral Sci* 2012;20:661-6.

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

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

FIGURES LEGENDS

Table 1 - Descriptive chart for the experimental groups and disinfection protocols used.

Experimental Group	n	Contamination/LPS	Clínic Protocol
C+	10	Yes	Without treatment
C-	10	No	Without treatment
OZY 1p	10	Yes	OZY® System (1 pulse - 120 sec.)
OZY 4p	10	Yes	OZY® System (4 pulses - 24 sec. each)
ENDOX	10	Yes	Endox® System

Figure 01 - Adapter at the “Oto” tip of the OZY® system: A (“endodontic” tip), B (adapter), C (“Oto” tip) and D (mounted OZ® system).

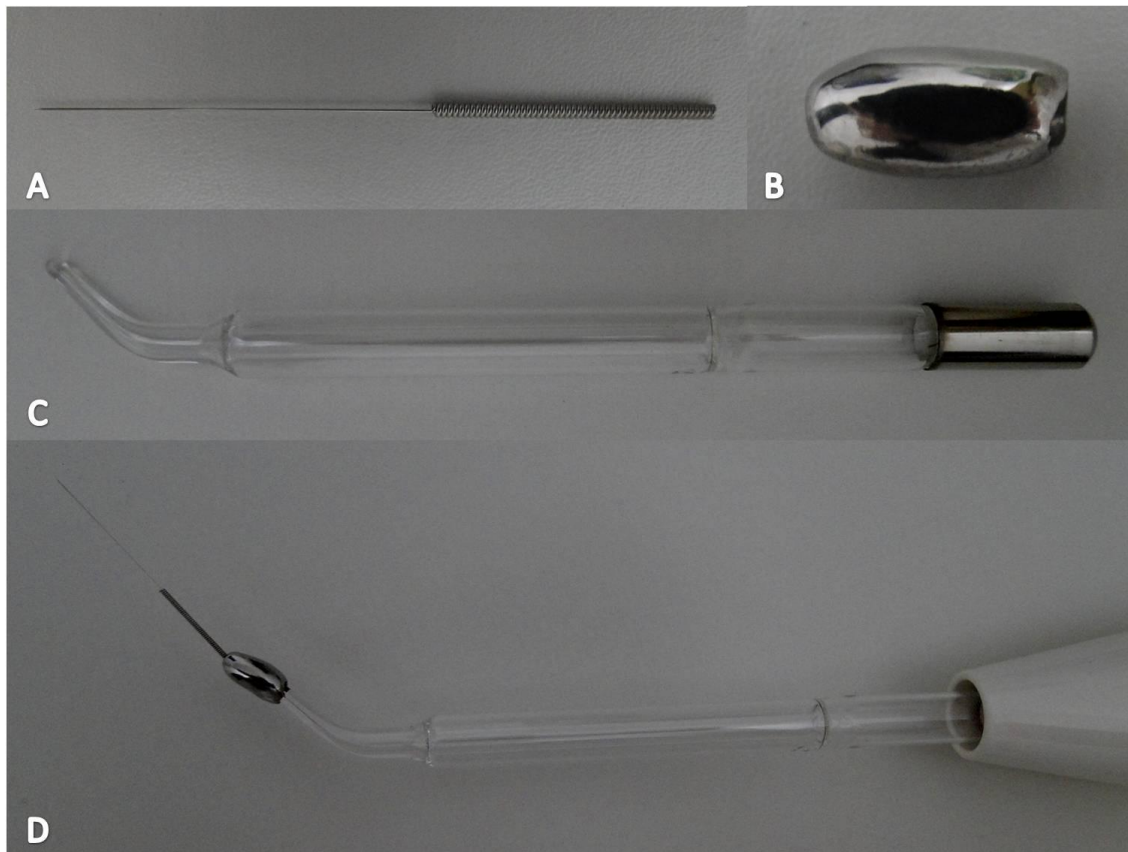
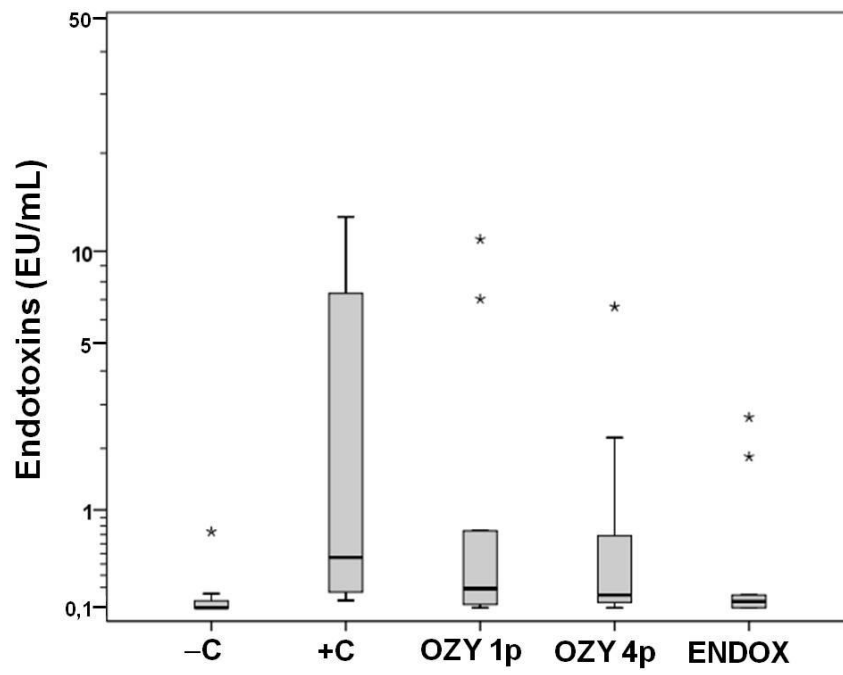


Figure 02 - Boxplot distribution of the endotoxin concentration in EU/mL for each experimental group.



Discussão Geral

Discussão Geral

Devido à complexidade anatômica do sistema de canais radiculares, a realização do tratamento endodôntico de forma convencional, com o uso de uma solução irrigadora antimicrobiana durante o procedimento de instrumentação e de uma medicação intracanal, não nos garante um protocolo totalmente eficaz e efetivo de desinfecção (GOMES *et al.*, 1996; ALVES *et al.*, 2011). A dificuldade existente no processo de sanificação de determinadas espécies microbianas e na neutralização do LPS bacteriano é sem sombra de dúvida um dos maiores desafios na Endodontia. Os estudos realizados até o momento não encontraram nenhuma substância ou dispositivo que seja ideal para os objetivos almejados no tratamento endodôntico de dentes contaminados (SIQUEIRA JR. *et al.*, 2002; GOMES *et al.*, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2007a; DORNELLES-MORGENTAL *et al.*, 2011). Sendo assim, este estudo teve como princípio avaliar a eficácia de dois sistemas, a base de gás ozônio e de pulsos elétricos de alta frequência, como recursos auxiliares ao tratamento endodôntico convencional.

Como meio para contaminação dos canais radiculares, foram utilizados endotoxinas de *Escherichia coli*. Mesmo que a *Escherichia coli* não seja comumente encontrada em canais radiculares com necrose pulpar, no estudo de Maekawa *et al.* (2011) pode-se verificar a presença da mesma em lesões periapicais. Estudos como o de Tanomaru *et al.* (2003), Silva *et al.* (2004), Oliveira *et al.* (2007b), Maekawa *et al.* (2011), Signoretti *et al.* (2011), Archilla *et al.* (2012) e Marinho *et al.* (2012), também utilizaram em seus experimentos o sorotipo (O55:B5) de LPS, proveniente dessa mesma espécie microbiana.

Além disso, a endotoxina de *Escherichia coli* (O55:B5) utilizada é de fácil aquisição e nos possibilita a padronização da contaminação das amostras. Até existem

métodos de purificação e extração de outras endotoxinas de bactérias *Porphyromonas* e *Prevotellas* (IKI *et al.*, 1997; ASAI *et al.*, 2005), porém as técnicas para obtenção são muito complexas. Outra questão importante a ser ressaltada é que já se sabe que o poder de agressão da endotoxina de *Escherichia coli* é superior ao de outras espécies (DARVEAU, 1998; DIXON; DARVEAU, 2005).

A maioria dos estudos endodônticos publicados sobre endotoxinas foram realizados em modelos experimentais *in vivo*, seja em humanos, para quantificar clinicamente os níveis de endotoxinas já existentes (JACINTO *et al.*, 2005; VIANNA *et al.*, 2007; MARTINHO; GOMES, 2008; GOMES *et al.*, 2009; MARTINHO *et al.*, 2010b; MARTINHO *et al.*, 2011; ENDO *et al.*, 2012; GOMES *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2012; ADL *et al.*, 2013; XAVIER *et al.*, 2013; MARTINHO *et al.*, 2014b; SOUSA *et al.*, 2014), ou seja em cães, para inoculação de endotoxinas nos animais e induzir a formação de lesões periapicais previamente a execução do tratamento (SILVA *et al.*, 2002; TANOMARU *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2004). Porém, hoje, com as limitações éticas junto aos Comitês de Pesquisa, a realização de estudos experimentais com animais esta cada vez mais comprometida e impossibilitada. Dessa forma, modelos *in vitro* com o uso de dentes humanos surge como uma alternativa. Estudos como o de Alves *et al.* (1998), Carratù *et al.* (2002), Tang *et al.* (2002), Oliveira *et al.* (2005), Williamson *et al.* (2005), Oliveira *et al.* (2007b), Maekawa *et al.* (2011), Signoretti *et al.* (2011), Archilla *et al.* (2012) e Marinho *et al.* (2012) utilizaram dentes humanos extraídos em experimentos com endotoxinas de *Escherichia coli*. No entanto, as dificuldades existentes na obtenção de determinados grupos dentários e para padronização da amostra têm feito com que pesquisadores busquem outras alternativas aos dentes humanos.

O dente de origem bovina é uma possibilidade, pois é um material biológico de fácil obtenção (ALMEIDA *et al.*, 2009). Além disso, a faixa etária e a obtenção de dentes bovinos intactos podem ser controladas, tornando-se, assim, uma vantagem (WILDER JÚNIOR *et al.*, 1998). Sendo assim, inicialmente, buscou-se no primeiro artigo analisar a viabilidade na utilização de dente bovino em substituição ao humano em experimentos *in vitro* com contaminação por LPS bacteriano. Não há na literatura nenhum estudo com contaminação por endotoxinas em dentes bovinos a fim de validar este modelo experimental para esse tipo de ensaio laboratorial.

Entretanto, os resultados obtidos foram contraditórios. A utilização de dentes bovinos não apresentou ser uma boa opção de modelo experimental para pesquisas laboratoriais com contaminação por endotoxinas, frente ao método de apirogenização proposto. Pôde-se observar, de acordo com os resultados, diferença estatística entre os dois modelos testados (humano e bovino). Além disso, entre os dentes bovinos contaminados por endotoxinas (BP – controle positivo) e não contaminados (BN – controle negativo) não se verificou diferença significativa. Houve, inclusive, uma tendência a potencialização no nível de LPS no grupo positivo. Logo, gerou-se a dúvida se o dente bovino já possui uma contaminação prévia por endotoxinas. Com relação ao processo de apirogenização utilizado, é de se questionar se ele não é efetivo para esta espécie dentária.

Alguns estudos consultados, na área da Medicina Veterinária, observaram a associação de *Escherichia coli* e suas endotoxinas com o gado e seus produtos derivados, levando pesquisadores a buscar maneiras de contornar esta zoonose por meio de práticas de abates específicos e formas para descontaminação da própria carcaça animal (CASTILLO *et al.*, 1999; BERRY; CUTTER, 2000; KANG *et al.*, 2001). No entanto, muitos fatores podem influenciar a contaminação dos animais, tais como:

- Idade = segundo Cray e Moon (1995), a contaminação por *Escherichia coli* é significativamente maior nos bovinos jovens do que nos adultos. Os animais adultos têm um compartimento de pança e rúmen totalmente desenvolvido, em que a combinação de uma concentração de ácidos graxos voláteis e um baixo pH inibe o crescimento da *Escherichia coli* O157:H7 (RASMUSSEN *et al.*, 1993). Isso é importante ser ressaltado e analisado, pois a maioria dos bovinos utilizados para abate em frigoríficos são jovens, devido principalmente a exigência do mercado consumidor. Logo, acredita-se que as carcaças dentárias utilizadas no estudo sejam na sua grande maioria provenientes de bovinos jovens.

- Estação do ano = segundo os resultados do estudo de Hancock *et al.* (1997), a prevalência de *Escherichia coli* no gado criado no estado de Washington (USA) foi maior no período de junho ($2\pm 6\%$) do que em dezembro (0%), ou seja, há uma maior probabilidade de incidência desse microrganismo nos bovinos no período do ano de maior calor (verão).

- Dieta animal = a dieta utilizada para engorda dos animais se dá na grande maioria dos casos por cereais (amido) ou por feno. O amido, diferentemente do feno, ao ser digerido pelo animal, passa através do rúmen para os intestinos, porém não é degradado na sua totalidade. Os bovinos são deficientes da enzima amilase. Conseqüentemente, o amido vai para o cólon onde a *Escherichia coli* se faz presente; faz uso desse alimento para a sua manutenção e sobrevivência, constituindo-se assim numa importante fonte energética (DIEZ-GONZALEZ *et al.*, 1998).

- Preparo do animal para o abate = quando os bovinos são preparados para o abate, eles podem ser privados de alimento quando o mesmo não está disponível ou é recusado. O aumento da susceptibilidade à infecção pelos bezerros em jejum é consistente nos

estudos, em que o líquido ruminal do gado em jejum permite o crescimento irrestrito da *Escherichia coli* (RASMUSSEN *et al.*, 1993).

- Ambiente de confinamento dos animais = a *Escherichia coli* é disseminada a partir de uma fonte comum e as tensões podem persistir num rebanho por um período de 2 anos (SHERE *et al.*, 1998). Ou seja, estando um animal contaminado com *Escherichia coli*, o resto do rebanho confinado com ele estará sujeito a contaminação também. Além disso, outros fatores também podem influenciar na contaminação do rebanho, tais como, a forma de criação dos bovinos: em invernada ou em confinamento. Em invernada, os animais estão mais expostos a contaminação com *Escherichia coli*, pois o microrganismo pode ser transportado e difundido ao rebanho por meio de pássaros previamente contaminados. Já no confinamento, isso é mais fácil de controlar e administrar, até mesmo com relação ao tipo de alimento que o animal está ingerindo.

Sendo assim, existe a possibilidade da arcada dentária recolhida no abate e utilizada no estudo já ter sido contaminada previamente.

Já a questão do processo de apirogenização utilizado sobre os dentes bovinos, com uso da radiação gama com Cobalto 60, parece não ser a melhor alternativa para sanificação do LPS ou talvez o protocolo empregado deva ser outro, quando comparado ao realizado para dentes humanos. O tratamento de apirogenização de dentes humanos já esta consolidado e consagrado, vide estudos de Oliveira *et al.* (2007b), Maekawa *et al.* (2011) e Signoretti *et al.* (2011), que utilizaram o mesmo protocolo do estudo e obtiveram também descontaminação total das amostras do grupo controle negativo.

A *Escherichia coli* é sorotipada com base na presença dos antígenos somáticos (antígeno O), flagelares (antígeno H) e capsulares (antígeno K) (NATARO; KAPER, 1998). O antígeno O é parte do LPS que compõe a parede celular. A ordem, a composição e o número de oligossacarídeos que o formam conferem a diversidade deste antíge-

no. São conhecidos mais de 180 sorogrupos O e mais de 60 sorogrupos H, sendo possíveis mais de 10.000 combinações entre estes antígenos (ROBINS-BROWNE; HARTLAND, 2002). Sendo assim, pode-se observar que o sorotipo da *Escherichia coli* usada no experimento (O55:B5) é diferente do normalmente encontrado em bovinos (O157:H7). Porém, acredita-se que isso não tenha influenciado nos resultados obtidos no processo de apirogenização dos dentes bovinos. Além disso, o kit de ensaio cinético do LAL turbidimétrico (*Pyrogen 5000*®) provavelmente não tem capacidade de diferenciar esses dois sorotipos de endotoxinas de *Escherichia coli*. Para corroborar com esta afirmação, esse kit também é utilizado em estudos *in vivo* com pacientes, tais como, Jacinto *et al.* (2005), Martinho e Gomes (2008) e Endo *et al.* (2012), a fim de quantificar um *pool* diverso de tipos de endotoxinas em canais radiculares contaminados.

Acredita-se que antes de inviabilizar totalmente o uso de dentes bovinos em estudos com endotoxinas é necessário a realização de novos experimentos a fim de testar diferentes protocolos para sanificação e apirogenização das peças dentárias.

Com relação ao segundo artigo, para avaliar a eficácia dos dois sistemas auxiliares sobre a endotoxina, foram utilizados, então, canais radiculares humanos. Os dentes foram contaminados com uma concentração de 50,37 EU/mL, pois a endotoxina se difunde também pelos túbulos dentinários e pelas irregularidades do sistema de canais, não se restringindo apenas ao canal principal. Os níveis de endotoxina encontrados no grupo controle positivo variaram de 0,1 a 12,8 EU/mL, o que está de acordo com os níveis médios observados no estudo de Gomes *et al.* (2012), que foram de 7,49 EU/mL e 3,96 EU/mL em infecções endodônticas primárias e secundárias, respectivamente. De qualquer forma, traçar uma comparação exata nos níveis iniciais de endotoxina entre os diferentes estudos é muito difícil, pois há influência tanto das amostras dentárias utilizadas quanto das questões metodológicas empregadas.

O ensaio cinético do LAL turbidimétrico (*Pyrogent 5000®*) foi utilizado no estudo a fim de medir os níveis de endotoxinas, assim como nos estudos de Jacinto *et al.* (2005), Williamson *et al.* (2005), Martinho e Gomes (2008), Martinho *et al.* (2010a) e Endo *et al.* (2012). Em 2011, Martinho *et al.* compararam diferentes métodos utilizados para quantificação dos níveis de endotoxinas e observaram que os testes cinético turbidimétrico e cinético cromogênico obtiveram uma melhor reprodutibilidade em comparação a análise cromogênica. Segundo Hurley (1995), ambos os testes apresentam uma maior precisão na detecção do LPS bacteriano: 0,01 a 100 EU/mL e 0,005 a 50 EU/mL, respectivamente. Assim, demonstra-se que a aferição dos níveis de endotoxina utilizados na contaminação dos canais esta de acordo com a faixa de detecção do teste empregado no estudo.

Na análise dos dois sistemas testados, nenhum apresentou uma eficácia significativa na redução ou inativação do LPS bacteriano. Com relação à utilização do sistema de eletrofulguração no interior dos canais radiculares, o resultado obtido está de acordo com a afirmação de Cassanelli *et al.* (2008). Segundo os autores, esse tipo de sistema tem uma maior efetividade na sua aplicação sobre microbianos revestidos por uma membrana celular e não sobre os seus subprodutos. Já na análise dos resultados obtidos com o gás ozônio, os mesmos estão de acordo com o estudo de Cardoso *et al.* (2008) que também não verificaram nenhum poder para neutralização do LPS bacteriano com uso da água ozonizada.

Por outro lado, já se sabe que a realização do preparo químico mecânico apenas reduz os níveis de endotoxina no interior dos canais radiculares (MARTINHO; GOMES, 2008; MARTINHO *et al.*, 2010b; ENDO *et al.*, 2012; ADL *et al.*, 2013; XAVIER *et al.*, 2013; MARTINHO *et al.*, 2014b), porém não há relatos ainda na literatura quanto a sua erradicação.

A utilização de uma solução irrigadora antimicrobiana associada ao ato de instrumentação do canal radicular não aparenta ser um fator fundamental para a redução do LPS bacteriano. Seja a solução de hipoclorito de sódio ou o digluconato de clorexidina, independentemente da concentração, há pouco ou nenhum efeito sobre a endotoxina (AIBEL; STEVENS, 1999; TANOMARU *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2007b; GOMES *et al.*, 2009). Sousa *et al.* (2014), assim como Martinho *et al.* (2010b), verificaram um valor médio na redução do LPS de 96,27% nos canais preparados com um irrigante inerte (solução salina apirogênica). De acordo com Oliveira *et al.* (2012), a redução dos níveis de endotoxinas no interior dos canais se dá ao próprio processo de instrumentação, irrigação e aspiração, independentemente da solução irrigadora utilizada. Somente com o ato de instrumentação já há um processo de redução do LPS bacteriano. Marinho *et al.* (2012) avaliaram a influência do alargamento apical durante o preparo rotatório com o sistema MTwo® e observaram que a medida que se aumentou o calibre do instrumento, maior foi a redução dos níveis de endotoxinas no interior dos canais (#25/.06 - 89,2%; #30/.05 - 95,9%; #35/.04 - 97,8%; #40/.04 - 98,2%). Segundo Barthel *et al.* (1997), o LPS bacteriano se adere de forma irreversível aos tecidos mineralizados, tornando-se difícil a sua remoção da parede dentinária sem haver o ato de instrumentação.

Já a utilização de uma medicação intracanal a base de hidróxido de cálcio, a fim de atuar em regiões onde o instrumento endodôntico não apresenta poder de ação, os resultados têm demonstrado uma boa eficácia desse composto sobre o LPS bacteriano, porém, também não há um processo de sanificação total do sistema de canais radiculares (SILVA *et al.*, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2007b; VIANNA *et al.*, 2007; SIGNORETTI *et al.*, 2011; ADL *et al.*, 2013; SOUSA *et al.*, 2014). Xavier *et al.* (2013) compararam a eficácia do tratamento endodôntico realizado

em uma ou duas consultas com relação à inativação e remoção do LPS bacteriano. Os autores verificaram que com o uso de uma medicação intracanal entre as sessões de tratamento houve uma maior redução dos níveis de endotoxinas do que a realização do tratamento feito em uma única sessão. Segundo ADL *et al.* (2013), o hidróxido de cálcio tem o poder de quebrar as ligações éster da fracção lipídica da endotoxina (SAFAVI; NICHOLS, 1993) e, conseqüentemente, de alterar as propriedades biológicas da mesma (SAFAVI; NICHOLS, 1994; BARTHEL *et al.*, 1997), tais como, a capacidade de estimular a prostaglandina E2 e TNF-alfa por monócitos, que estão intimamente relacionados com a destruição dos tecidos ósseos.

Dessa forma, é importante a busca de novos materiais e medicações que auxiliem o processo de dessinfecção e sanificação do sistema de canais radiculares para, assim, erradicarmos a contaminação de maneira eficaz em dentes infectados e, conseqüentemente, elevarmos os índices de sucesso no tratamento.

Conclusões

Conclusões

A partir dos resultados do presente estudo pode-se concluir:

1. A utilização de dentes bovinos como modelo experimental em estudos laboratoriais com contaminação por endotoxina de *Escherichia coli* (O55:B5) não é uma opção ideal, em relação ao processo de apirogenização com radiação gama por cobalto 60, quando comparado ao uso de dentes humanos.
2. Os protocolos de desinfecção utilizados com os sistemas de gás ozônio e com o pulso elétrico de alta frequência não foram eficazes na eliminação da endotoxina de *Escherichia coli* (O55:B5) em canais radiculares humanos previamente contaminados.

Referências

Referências

- Adl A, Motamedifar M, Shams MS, Mirzaie A. Clinical investigation of the effect of calcium hydroxide intracanal dressing on bacterial lipopolysaccharide reduction from infected root canals. *Aust Endod J.* 2013;39(3):1-5.
- Aibel K, Stevens R. Effect of chlohexidine on IL-6 induction by LPS. *J Endod.* 1999;25:282.
- Almeida KG, Scheibe KG, Oliveira AE, Alves CM, Costa JF. Influence of human and bovine substrate on the microleakage of two adhesive systems. *J Appl Oral Sci.* 2009;17(2):92-6.
- Alves FR, Almeida BM, Neves MA, Moreno JO, Rôças IN, Siqueira Jr. JF. Disinfecting oval-shaped root canals: effectiveness of different supplementary approaches. *J Endod.* 2011;37(4):496-501.
- Alves J, Walton R, Drake D. Coronal leakage: endotoxin penetration from mixed bacterial communities through obturated, post-prepared root canals. *J Endod.* 1998;24(9):587-91.
- Aranda-Garcia AR, Guerreiro-Tanomaru JM, Faria-Júnior NB, Chavez-Andrade GM, Leonardo RT, Tanomaru-Filho M, Bonetti-Filho I. Antibacterial effectiveness of several irrigating solutions and the Endox Plus system - an ex vivo study. *Int Endod J.* 2012;45(12):1091-6.
- Archilla JR, Moreira MS, Miyagi SP, Bombana AC, Gutknecht N, Marques MM. Single session of Nd:YAG laser intracanal irradiation neutralizes endotoxin in dental root dentin. *J Biomed Opt.* 2012;17(11):1-5.
- Asai Y, Hashimoto M, Fletcher HM, Miyake K, Akira S, Ogawa T. Lipopolysaccharide preparation extracted from *Porphyromonas gingivalis* lipoprotein-deficient mutant shows a marked decrease in toll-like receptor 2-mediated signaling. *Infect Immun.* 2005;73(4):2157-63.
- Azarpazhooh A, Limeback H, Lawrence HP, Fillery ED. Evaluating the effect of an ozone delivery system on the reversal of dentin hypersensitivity: a randomized, double-blinded clinical trial. *J Endod.* 2009;35(1):1-9.
- Barthel CR, Levin LG, Reisner HM, Trope M. TNF-alpha release in monocytes after exposure to calcium hydroxide treated *Escherichia coli* LPS. *Int Endod J.* 1997;30(3):155-9.
- Berkiten M, Okar I, Berkiten R. In vitro study of the penetration of *Streptococcus sanguis* and *Prevotella intermedia* strains into human dentinal tubules. *J Endod.* 2000;26(4):236-9.

Berry ED, Cutter CN. Effects of acid adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 on efficacy of acetic acid spray washes to decontaminate beef carcass tissue. *Appl Environ Microbiol.* 2000;66:1493-8.

Cardoso MG, Oliveira LD, Koga-Ito CY, Jorge AO. Effectiveness of ozonated water on *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, and endotoxins in root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008;105(3):85-91.

Carratù P, Amato M, Riccitiello F, Rengo S. Evaluation of leakage of bacteria and endotoxins in teeth treated endodontically by two different techniques. *J Endod.* 2002;28(4):272-5.

Case PD, Bird PS, Kahler WA, George R, Walsh LJ. Treatment of root canal biofilms of *Enterococcus faecalis* with ozone gas and passive ultrasound activation. *J Endod.* 2012;38(4):523-6.

Cassanelli C, Marchese A, Cagnacci S, Debbia EA. Alteration of membrane permeability of bacteria and yeast by high frequency alternating current (HFAC). *Open Microbiol J.* 2008;2(1):32-7.

Cassanelli C, Roveta S, Cavallini F, Marchese A, Debbia EA, Armanino R. Bactericidal effect of endox against various pathogens. 14th ECCMID, 2004. Abstr. P480. Prague: Czech Rep.

Castillo A, Lucia LM, Goodson KJ, Savell JW, Acuff GR. Decontamination of beef carcass surface tissue by steam vacuuming alone and combined with hot water and lactic acid sprays. *J Food Prot.* 1999;62:146-51.

Cheung GS, Ho MW. Microbial flora of root canal-treated teeth associated with asymptomatic periapical radiolucent lesions. *Oral Microbiol Immunol.* 2001;16(6):332-7.

Cray WC, Moon HW. Experimental infection of calves and adult cattle with *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol.* 1995;61:1586-90.

Darveau RP. Lipid A diversity and the innate host response to bacterial infection. *Curr Opin Microbiol.* 1998;1(1):36-42.

Diez-Gonzalez F, Callaway TR, Kizoulis MG, Russell JB. Grain feeding and the dissemination of acid-resistant *Escherichia coli* from cattle. *Science.* 1998;281:1666-8.

Dixon DR, Darveau RP. Lipopolysaccharide heterogeneity: innate host responses to bacterial modification of lipid a structure. *J Dent Res.* 2005;84(7):584-95.

Dornelles-Morgental R, Guerreiro-Tanomaru JM, Faria-Júnior NB, Hungaro-Duarte MA, Kuga MC, Tanomaru-Filho M. Antibacterial efficacy of endodontic irrigating solutions and their combinations in root canals contaminated with *Enterococcus faecalis*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2011;112(3):396-400.

Dyas A, Boughton BJ, Das BC. Ozone killing action against bacterial and fungal species; microbiological testing of a domestic ozone generator. *J Clin Pathol.* 1983;36(10):1102-4.

Emerson MA, Sproul OJ, Buck CE. Ozone inactivation of cell-associated viruses. *Appl Environ Microbiol.* 1982;43(3):603-8.

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

Eriksson AR, Albrektsson T. Temperature threshold levels for heat-induced bone tissue injury: a vital-microscopic study in the rabbit. *J Prosthet Dent.* 1983;50(1):101-7.

Filippi A. Lokalbehandlung von Otitis circumscripta mit ozoniertem Olivenöl. *Quintessence Int.* 1993;44:1531-7.

Garduño PG, Quijano JIG, Lara LGV, García SN, Muñoz EH. Efectos del agua ozonificada en la placa dentobacteriana. *Assoc Dent Med.* 1995;52:305-8.

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

Gomes BP, Ferraz CC, Garrido FD, Rosalen PL, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microbial susceptibility to calcium hydroxide pastes and their vehicles. *J Endod.* 2002;28(11):758-61.

Gomes BP, Lilley JD, Drucker DB. Variations in the susceptibilities of components of the endodontic microflora to biomechanical procedures. *Int Endod J.* 1996;29(4):235-41.

Gomes BP, Martinho FC, Vianna ME. Comparison of 2.5% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine gel on oral bacterial lipopolysaccharide reduction from primarily infected root canals. *J Endod.* 2009;35(10):1350-3.

Górnicki A, Gutsze A. In vitro effects of ozone on human erythrocyte membranes: an EPR study. *Acta Biochim Pol.* 2000;47(4):963-71.

Gurgan S, Firat E, Baysan A, Gutknecht N, Imazato S. Effects of ozone and ND:YAG laser pretreatment on bond strength of self-etch adhesives to coronal and root dentin. *Photomed Laser Surg.* 2010;28(2):S3-9.

Haffner C, Benz C, Folwaczny A, Mech A, Hickel R. High frequency current in endodontic therapy; an in-vitro study. *J Dent Res.* 1999a;78(1):117.

Haffner C, Benz C, Hickel R. Das Endox – Endodontiesystem: Weitere Laborergebnisse und erste Klinische Resultate. *ZWR.* 1999b;108(11):670-4.

Haffner C, Folwaczny M, Galler K, Hickel R. Accuracy of electronic apex locators in comparison to actual length - an in vivo study. *J Dent.* 2005;33(8):619-25.

- Hancock DD, Besser TE, Rice DH, Herriott DE, Tarr PI. A longitudinal study of *Escherichia coli* O157 in fourteen cattle herds. *Epidemiol Infect.* 1997;118:193-5.
- Hauser-Gerspach I, Pfäffli-Savtchenko V, Dähnhardt JE, Meyer J, Lussi A. Comparison of the immediate effects of gaseous ozone and chlorhexidine gel on bacteria in cavitated carious lesions in children in vivo. *Clin Oral Investig.* 2009;13(3):287-91.
- Hems RS, Gulabivala K, Ng YL, Ready D, Spratt DA. An in vitro evaluation of the ability of ozone to kill a strain of *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J.* 2005;38(1):22-9.
- Hong CY, Lin SK, Kok SH, Cheng SJ, Lee MS, Wang TM, Chen CS, Lin LD, Wang JS. The role of lipopolysaccharide in infectious bone resorption of periapical lesion. *J Oral Pathol Med.* 2004;33(3):162-9.
- Horiba N, Maekawa Y, Abe Y, Ito M, Matsumoto T, Nakamura H. Correlations between endotoxin and clinical symptoms or radiolucent areas in infected root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1991;71(4):492-5.
- Hurley JC. Endotoxemia: methods of detection and clinical correlates. *Clin Microbiol Rev.* 1995;8(2):268-92.
- Huth KC, Jakob FM, Saugel B, Cappello C, Paschos E, Hollweck R, Hickel R, Brand K. Effect of ozone on oral cells compared with established antimicrobials. *Eur J Oral Sci.* 2006;114(5):435-40.
- Huth KC, Quirling M, Maier S, Kamereck K, Alkhayer M, Paschos E, Welsch U, Miethke T, Brand K, Hickel R. Effectiveness of ozone against endodontopathogenic microorganisms in a root canal biofilm model. *Int Endod J.* 2009;42(1):3-13.
- Iki K, Kawahara K, Sawamura S, Arakaki R, Sakuta T, Sugiyama A, Tamura H, Sueda T, Hamada S, Takada H. A novel component different from endotoxin extracted from *Prevotella intermedia* ATCC 25611 activates lymphoid cells from C3H/HeJ mice and gingival fibroblasts from humans. *Infect Immun.* 1997;65(11):4531-8.
- Jacinto RC, Gomes BP, Shah HN, Ferraz CC, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Quantification of endotoxins in necrotic root canals from symptomatic and asymptomatic teeth. *J Med Microbiol.* 2005;54(8):777-83.
- Johansson E, Claesson R, van Dijken JW. Antibacterial effect of ozone on cariogenic bacterial species. *J Dent.* 2009;37(6):449-53.
- Takehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposure of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1965;20(3):340-9.
- Kang DH, Koohmaraie M, Dorsa WJ, Siragusa GR. Development of a multiple-step process for the microbial decontamination of beef trim. *J Food Prot.* 2001;64:63-71.

Karale R, Thakore A, Shetty V. An evaluation of antibacterial efficacy of 3% sodium hypochlorite, high-frequency alternating current and 2% chlorhexidine on *Enterococcus faecalis*: An in vitro study. *J Conserv Dent*. 2011;14(1):2-5.

Khabbaz MG, Anastasiadis PL, Sykaras SN. Determination of endotoxins in the vital pulp of human carious teeth: association with pulpal pain. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2001;91(5):587-93.

Kustarci A, Sümer Z, Altunbas D, Kosum S. Bactericidal effect of KTP laser irradiation against *Enterococcus faecalis* compared with gaseous ozone: an ex vivo study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009;107(5):73-9.

Lendini M, Alemanno E, Migliaretti G, Berutti E. The effect of high-frequency electrical pulses on organic tissue in root canals. *Int Endod J*. 2005;38(8):531-8.

Leonardo MR, Silva RA, Assed S, Nelson-Filho P. Importance of bacterial endotoxin (LPS) in endodontics. *J Appl Oral Sci*. 2004;12(2):93-8.

Maekawa LE, Valera MC, Oliveira LD, Carvalho CA, Koga-Ito CY, Jorge AO. In vitro evaluation of the action of irrigating solutions associated with intracanal medications on *Escherichia coli* and its endotoxin in root canals. *J Appl Oral Sci*. 2011;19(2):106-12.

Magni E, Ferrari M, Hickel R, Huth KC, Ilie N. Effect of ozone gas application on the mechanical properties of dental adhesives bonded to dentin. *Dent Mater*. 2008;24(10):1428-34.

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

Martinho FC, Chiesa WM, Leite FR, Cirelli JA, Gomes BP. Antigenic activity of bacterial endodontic contents from primary root canal infection with periapical lesions against macrophage in the release of interleukin-1beta and tumor necrosis factor alpha. *J Endod*. 2010a;36(9):1467-74.

Martinho FC, Chiesa WM, Marinho AC, Zaia AA, Ferraz CC, Almeida JF, Souza-Filho FJ, Gomes BP. Clinical investigation of the efficacy of chemomechanical preparation with rotary nickel-titanium files for removal of endotoxin from primarily infected root canals. *J Endod*. 2010b;36(11):1766-9.

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

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

Martinho FC, Gomes AP, Fernandes AM, Ferreira NS, Endo MS, Freitas LF, Camões IC. Clinical comparison of the effectiveness of single-file reciprocating systems and

rotary systems for removal of endotoxins and cultivable bacteria from primarily infected root canals. *J Endod.* 2014b;40(5):625-9.

Martinho FC, Leite FR, Nascimento GG, Cirelli JA, Gomes BP. Clinical investigation of bacterial species and endotoxin in endodontic infection and evaluation of root canal content activity against macrophages by cytokine production. *Clin Oral Investig.* 2014a Feb 13. [Epub ahead of print]

Morrison DC, Kline LF. Activation of the classical and properdin pathways of complement by bacterial lipopolysaccharides (LPS). *J Immunol.* 1977;118(1):362-8.

Müller P, Guggenheim B, Schmidlin PR. Efficacy of gasiform ozone and photodynamic therapy on a multispecies oral biofilm in vitro. *Eur J Oral Sci.* 2007;115(1):77-80.

Müller WD. An introduction to the study of the bacteriopathology of the dental pulp. *Dental Cosmos.* 1894;36:505-28.

Murad CF, Sassone LM, Faveri M, Hirata R Jr, Figueiredo L, Feres M. Microbial diversity in persistent root canal infections investigated by checkerboard DNA-DNA hybridization. *J Endod.* 2014;40(7):899-906.

Murakami H, Sakuma S, Nakamura K, Ito Y, Hattori M, Asai A, Noguchi T, Maeda H, Kameyama Y, Kimura Y, Nagao T, Kawai T, Hasegawa J. Disinfection of removable dentures using ozone. *Dent Mater J.* 1996;15(2):220-5.

Nagayoshi M, Kitamura C, Fukuizumi T, Nishihara T, Terashita M. Antimicrobial effect of ozonated water on bacteria invading dentinal tubules. *J Endod.* 2004;30(11):778-81.

Nair PN. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2004;15(6):348-81.

Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev.* 1998;11:142-201.

Oliveira DP, Barbizam JV, Trope M, Teixeira FB. In vitro antibacterial efficacy of endodontic irrigants against *Enterococcus faecalis*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007a;103(5):702-6.

Oliveira LD, Carvalho CA, Carvalho AS, Alves JS, Valera MC, Jorge AO. Efficacy of endodontic treatment for endotoxin reduction in primarily infected root canals and evaluation of cytotoxic effects. *J Endod.* 2012;38(8):1053-7.

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

Oliveira LD, Jorge AO, Carvalho CA, Koga-Ito CY, Valera MC. In vitro effects of endodontic irrigants on endotoxins in root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007b;104(1):135-42.

Pereira MMS, Navarini A, Mimica LMJ, Pacheco AMJ, Silva RA. Efeito de diferentes gases sobre o crescimento bacteriano: Estudo in vitro. Rev Col Bras Cirurg. 2005;32(1):12-4.

Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Sousa EL, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. Int Endod J. 2003;36(1):1-11.

Polydorou O, Halili A, Wittmer A, Pelz K, Hahn P. The antibacterial effect of gas ozone after 2 months of in vitro evaluation. Clin Oral Investig. 2012;16(2):545-50.

Rasmussen MA, Cray WC Jr, Casey TA, Whipp SC. Rumen contents as a reservoir of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. FEMS Microbiol Lett. 1993;114(1):79-84.

Robins-Browne RM, Hartland EL. *Escherichia coli* as a cause of diarrhea. J Gastroenterol Hepatol. 2002;17(4):467-75.

Roveta S, Armanino R, Debbia EA. Valutazione in vitro dell'effetto battericida dell'Endox® su vari patogeni. Congr. Naz. SIMMOC abstr 24. Genova, 2004.

Safavi KE, Nichols FC. Effect of calcium hydroxide on bacterial lipopolysaccharide. J Endod. 1993;19(2):76-8.

Safavi KE, Nichols FC. Alteration of biological properties of bacterial lipopolysaccharide by calcium hydroxide treatment. J Endod. 1994;20(3):127-9.

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

Shere JA, Bartlett KJ, Kaspar CW. Longitudinal study of *Escherichia coli* O157:H7 dissemination on four dairy farms in Wisconsin. Appl Environ Microbiol. 1998;64:1390-9.

Signoretti FG, Gomes BP, Montagner F, Barrichello Tosello F, Jacinto RC. Influence of 2% chlorhexidine gel on calcium hydroxide ionic dissociation and its ability of reducing endotoxin. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2011;111(5):653-8.

Silva LAB, Leonardo MR, Assed S, Tanomaru Filho M. Histological study of the effect of some irrigating solutions on bacterial endotoxin in dogs. Braz Dent J. 2004;15(2):109-14.

Silva L, Nelson-Filho P, Leonardo MR, Rossi MA, Pansani CA. Effect of calcium hydroxide on bacterial endotoxin in vivo. J Endod. 2002;28(2):94-8.

Siqueira Jr. JF, Alves FR, Rôças IN. Pyrosequencing analysis of the apical root canal microbiota. J Endod. 2011;37(11):1499-503.

Siqueira Jr. JF. Endodontic infections: Concepts, paradigms, and perspectives. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2002;94(3):281-93.

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

Siqueira Jr. JF, Rôças IN, Santos SR, Lima KC, Magalhães FA, Uzeda M. Efficacy of instrumentation techniques and irrigation regimens in reducing the bacterial population within root canals. *J Endod.* 2002;28(3):181-4.

Sousa EL, Martinho FC, Nascimento GG, Leite FR, Gomes BP. Quantification of endotoxins in infected root canals and acute apical abscess exudates: monitoring the effectiveness of root canal procedures in the reduction of endotoxins. *J Endod.* 2014;40(2):177-81.

Stashenko P, Teles R, D'Souza R. Periapical inflammatory responses and their modulation. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1998;9(4):498-521.

Stoll R, Venne L, Jablonski-Momeni A, Mutters R, Stachniss V. The disinfecting effect of ozonized oxygen in an infected root canal: an in vitro study. *Quintessence Int.* 2008;39(3):231-6.

Stübinger S, Sader R, Filippi A. The use of ozone in dentistry and maxillofacial surgery: a review. *Quintessence Int.* 2006;37(5):353-9.

Sundqvist G. Ecology of the root canal flora. *J Endod.* 1992;18(9):427-30.

Tang HM, Torabinejad M, Kettering JD. Leakage evaluation of root end filling materials using endotoxin. *J Endod.* 2002;28(1):5-7.

Tanomaru JM, Leonardo MR, Tanomaru Filho M, Bonetti Filho I, Silva LA. Effect of different irrigation solutions and calcium hydroxide on bacterial LPS. *Int Endod J.* 2003;36(11):733-9.

Tennert C, Fuhrmann M, Wittmer A, Karygianni L, Altenburger MJ, Pelz K, Hellwig E, Al-Ahmad A. New bacterial composition in primary and persistent/secondary endodontic infections with respect to clinical and radiographic findings. *J Endod.* 2014;40(5):670-7.

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

Virtej A, MacKenzie CR, Raab WH, Pfeffer K, Barthel CR. Determination of the performance of various root canal disinfection methods after in situ carriage. *J Endod.* 2007;33(8):926-9.

Wilder Júnior AD, Swift EJ Jr, May KN Jr, Waddell SL. Bond strengths of conventional and simplified bonding systems. *Am J Dent.* 1998;11(3):114-7.

Williamson AE, Dawson DV, Drake DR, Walton RE, Rivera EM. Effect of root canal filling/sealer systems on apical endotoxin penetration: a coronal leakage evaluation. *J Endod.* 2005;31(8):599-604.

Xavier AC, Martinho FC, Chung A, Oliveira LD, Jorge AO, Valera MC, Carvalho CA. One-visit versus two-visit root canal treatment: effectiveness in the removal of endotoxins and cultivable bacteria. *J Endod.* 2013;39(8):959-64.

Zaura E, Buijs MJ, Ten Cate JM. Effects of ozone and sodium hypochlorite on caries-like lesions in dentin. *Caries Res.* 2007;41(6):489-92.

Anexos

Anexos

Anexo A – Carta de aprovação pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia/PUCRS.



SIPESQ
Sistema de Pesquisas da PUCRS



Código SIPESQ: 5859

Porto Alegre, 28 de agosto de 2014.

Prezado(a) Pesquisador(a),

A Comissão Científica da FACULDADE DE ODONTOLOGIA da PUCRS apreciou e aprovou o Projeto de Pesquisa "ANÁLISE, IN VITRO, DA REDUÇÃO DE ENDOTOXINAS EM CANAIS RADICULARES CONTAMINADOS, APÓS O EMPREGO DE SISTEMAS DE GÁS OZÔNIO E ELETROFULGURAÇÃO" coordenado por JOSE ANTONIO P DE FIGUEIREDO. Caso este projeto necessite apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e/ou da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), toda a documentação anexa deve ser idêntica à documentação enviada ao CEP/CEUA, juntamente com o Documento Unificado gerado pelo SIPESQ.

Atenciosamente,

Comissão Científica da FACULDADE DE ODONTOLOGIA

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE
CATÓLICA DO RIO GRANDE
DO SUL - PUC/RS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ANÁLISE, IN VITRO, DA REDUÇÃO DE ENDOTOXINAS EM CANAIS RADICULARES CONTAMINADOS, APÓS O EMPREGO DE SISTEMAS DE GÁS OZÔNIO E ELETROFULGURAÇÃO

Pesquisador: José Antonio poli de Figueiredo

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 35501414.0.0000.5336

Instituição Proponente: UNIAO BRASILEIRA DE EDUCACAO E ASSISTENCIA

Patrocinador Principal: Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 811.207

Data da Relatoria: 26/09/2014

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto de Doutorado do Programa de Pós-graduação em Odontologia, da área de Endodontia. O estudo proposto será experimental in vitro com dentes humanos extraídos e previamente contaminados com endotoxinas bacterianas.

O estudo tem parceria com empresa (MK Life® - Medical and Dental Products) situada no Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento do Parque Científico e Tecnológico da PUCRS. Neste estudo será desenvolvida uma ponta endodôntica específica para o sistema OZY®.

Objetivo da Pesquisa:

O estudo visa avaliar o efeito do gás ozônio e de pulsos elétricos de alta frequência sobre o nível de endotoxinas (LPS) em canais radiculares contaminados com endotoxinas de Escherichia coli.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há riscos ou benefícios aos indivíduos, uma vez que se trata de um estudo in vitro, realizado com dentes humanos extraídos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Serão utilizados 50 pré-molares inferiores humanos monorradiculares obtidos junto a consultórios odontológicos particulares, os quais foram extraídos por indicação terapêutica. Para doação dos

Endereço: Av. Ipiranga, 6681, prédio 40, sala 505
Bairro: Partenon **CEP:** 90.619-900
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3320-3345 **Fax:** (51)3320-3345 **E-mail:** cep@pucrs.br

Continuação do Parecer: 811.207

dentes para o estudo os pacientes assinarão um termo de consentimento livre e esclarecido.

Os espécimes serão previamente radiografados. Após a realização do procedimento de limpeza, os dentes serão secos e esterilizados.

Inicialmente será realizada a remoção da coroa dentária. Após, o canal radicular será localizado com o auxílio de uma sonda e o tecido pulpar será removido. Em todos os dentes será realizado um preparo prévio do batente apical, seguindo o protocolo da técnica seriada.

Os dentes serão fixados aleatoriamente em placas de cultura (12 poços, TPP®, Switzerland) com Durepoxi. Em cada placa haverá dois dentes de cada um dos cinco grupos experimentais:

G1 - 10 dentes, não contaminados e sem tratamento.

G2 - 10 dentes, contaminados e sem tratamento.

G3 - 10 dentes, contaminados e tratados com Sistema OZY® (1 pulso – 120 seg.).

G4 - 10 dentes, contaminados e tratados com Sistema OZY® (4 pulsos – 24 seg. cada).

G5 - 10 dentes, contaminados e tratados com Sistema Endox®.

Para a contaminação dos canais radiculares serão utilizadas endotoxinas de *Escherichia coli*. Sob uma capela de fluxo laminar, 20 L de uma solução padrão contendo endotoxina (1.000.000 UE mL⁻¹) serão inoculados nos canais radiculares usando para isso uma micropipeta digital.

Devido à inexistência de uma ponta específica para utilização do sistema OZY® na endodontia, será desenvolvido este artefato. O artefato será constituído, nos 24 mm iniciais, de um anel metálico. Esta porção é que será fixada no aparelho OZY®. Já a porção restante da ponta será confeccionada em vidro transparente a fim de conduzir o gás ozônio por toda a sua extensão.

O protocolo de uso do sistema Endox® será o mesmo descrito por Lendini et al. (2005). A sonda preta do aparelho, de 30 mm de comprimento e 0,20 mm de diâmetro, será introduzida no canal radicular. Serão realizados dois pulsos no terço médio do canal radicular (5 mm aquém do CT) e outros dois pulsos no terço apical (no CT). Ao total serão quatro pulsos (600 kHz) por canal radicular, com um tempo padronizado de 1/10 de segundo para cada aplicação.

A análise da quantificação das endotoxinas presentes nos canais será feita por meio do teste

Endereço: Av. Ipiranga, 6681, prédio 40, sala 505
Bairro: Partenon CEP: 90.619-900
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3320-3345 Fax: (51)3320-3345 E-mail: cep@pu.rs.br

Continuação do Parecer: 811.207

turbidimétrico. O teste LAL Pyrogen - 5000 é um ensaio cinético quantitativo para detecção de endotoxina de bactérias Gram-negativas que, quando ativado, converte o coagulogênio em coagulina, ocasionando a turbidez na amostra.

Após a incubação do LAL, as absorbâncias das soluções padrão de endotoxina serão medidas individualmente usando um leitor de ELISA (Ultramark, Bio-Rad, Foster City, CA, EUA). As amostras serão lidas em duplicata usando água aprotogênica como branco. Curvas padrão de endotoxina serão obtidas pela comparação de cada absorbância com a concentração correspondente. Quatro soluções de endotoxina serão preparadas com concentrações de 0,125; 0,25; 0,5 e 1,0 UE ml⁻¹. Os valores de absorbância das soluções previamente preparadas serão espectrofotometricamente medidos a 405 nm no leitor de ELISA.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os seguintes termos foram anexados:

- Folha de rosto da Plataforma Brasil
- Links para os lattes dos pesquisadores
- Carta de aprovação da CCEFO
- Carta de autorização do responsável pelo laboratório de Bioquímica e Microbiologia Oral da UFRGS
- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido de doação de dentes humanos.
- Orçamento

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências ou inadequações. O projeto está muito bem descrito, os dados da Plataforma Brasil preenchidos de forma adequada e toda a documentação necessária foi anexada.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av. Ipiranga, 6681, prédio 40, sala 505
Bairro: Partenon CEP: 90.619-900
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3320-3345 Fax: (51)3320-3345 E-mail: cep@pucrs.br

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE
CATÓLICA DO RIO GRANDE
DO SUL - PUC/RS



Continuação do Parecer: 811.207

Considerações Finais a critério do CEP:

PORTO ALEGRE, 29 de Setembro de 2014

Assinado por:
Rodolfo Herberto Schneider
(Coordenador)

Endereço: Av. Ipiranga, 6681, prédio 40, sala 505
Bairro: Partenon **CEP:** 90.619-900
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3320-3345 **Fax:** (51)3320-3345 **E-mail:** cep@pucrs.br

Anexo C – Carta de submissão do Artigo de Pesquisa 1 ao periódico *Dental Materials*.

Submission Confirmation for your paper Entrada x

Dental Materials dentistry.dentmatj@manchester.ac.uk por_eesmail.elsevier.com 16:11 (Há 14 minutos) ☆

para mim ▾

inglês ▾ > português ▾ Traduzir mensagem Desativar para: inglês x

Full Length Article

Dear Tiago,

Your submission entitled "Can bovine teeth be used as an experimental model for studies on endotoxin contamination?" has been received by Dental Materials

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/dema/>.

Your username is: tafmelo@gmail.com

If you need to retrieve password details, please go to: http://ees.elsevier.com/dema/automail_query.asp

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System

...

Dental Materials

Anexo D – Carta de submissão do Artigo de Pesquisa 2 ao periódico *Journal of Endodontics*.

Submission Confirmation for Quantification of lipopolysaccharide (LPS) levels in root canal infection after the use of ozone gas and high frequency electrical pulses   Entrada x

 The Journal of Endodontics <support@elsevier.com> 09:58 (Há 20 minutos) ☆  
para mim ▾

 inglês ▾ > português ▾ [Traduzir mensagem](#) [Desativar para: inglês x](#)

Dear Dr. Melo,

Your submission entitled "Quantification of lipopolysaccharide (LPS) levels in root canal infection after the use of ozone gas and high frequency electrical pulses" has been received by the Journal of Endodontics.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to the Journal of Endodontics web site as an author.

The URL is <http://ees.elsevier.com/joe/>

Your username is: tafmelo@gmail.com

If you need to retrieve password details,
please go to: http://ees.elsevier.com/joe/automail_query.asp

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to the Journal of Endodontics.

Kind regards,

Journal of Endodontics