

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: ENDODONTIA**

CLÁUDIA WAGNER

**EFICÁCIA DA ASSOCIAÇÃO DE INIBIDORES DA BOMBA DE PRÓTONS COM
PASTA DE HIDRÓXIDO DE CÁLCIO COMO MEDICAÇÃO INTRACANAL EM
DENTES DE RATOS COM LESÕES PERIAPICAIS**

Porto Alegre
2011

CLÁUDIA WAGNER

**EFICÁCIA DA ASSOCIAÇÃO DE INIBIDORES DA BOMBA DE PRÓTONS COM
PASTA DE HIDRÓXIDO DE CÁLCIO COMO MEDICAÇÃO INTRACANAL EM
DENTES DE RATOS COM LESÕES PERIAPICAIS**

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

DISSERTAÇÃO APRESENTADA COMO PARTE DOS
REQUISITOS OBRIGATÓRIOS PARA A OBTENÇÃO
DO TÍTULO DE MESTRE EM ODONTOLOGIA

Orientadora: Maria Martha Campos

Porto Alegre

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

W132e Wagner, Cláudia
Eficácia da associação de inibidores da bomba de prótons com pasta de hidróxido de cálcio como medicação intracanal em dentes de ratos com lesões periapicais / Cláudia Wagner. – Porto Alegre, 2011.
59 f.

Diss. (Mestrado) – PUCRS. Faculdade de Odontologia. Curso de Pós-Graduação em Odontologia. Linha de Pesquisa: Etiopatogênese e Tratamento das Doenças Periodontais e Periapicais.
Orientador: Profa. Dra. Maria Matha Campos.

1. Odontologia. 2. Endodontia. 3. Lesão Periapical. 4. Hidróxido de Cálcio. 5. Omeprazol. 6. Ratos – Experiências. I. Campos, Maria Martha. II. Título.

CDD 617.634

Bibliotecária Responsável: Dênira Remedi – CRB 10/1779

Aos meus pais, pelo apoio incondicional e ao meu noivo, pelo afeto e compreensão pelos momentos de ausência.

Agradecimentos Especiais

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Maria Martha Campos, pela dedicação, disponibilidade e auxílio na idealização e realização deste trabalho, mas, principalmente, por dividir sua paixão pela pesquisa em animais.

À Prof^a Dr^a Sílvia Dias de Oliveira, pela disponibilidade e paciência em dividir seus conhecimentos sobre os mistérios da microbiologia.

Ao aluno Valdir Cristóvão Barth Júnior, pela disposição, interesse e apuro técnico durante as etapas microbiológicas.

Aos doutorandos Carlos Frederico Brilhante Wolle e Alessandra Cesar Trindade pelas contribuições durante o desenvolvimento do projeto e colaboração durante a fase experimental.

À mestranda Caroline Marca, pela amizade que levarei por toda a vida e pela troca de conhecimentos que deram origem à investigação principal deste trabalho.

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, representada por seu diretor, Prof^o Dr. Marcos Tulio M. de Carvalho, pela excelente estrutura e qualidade de ensino proporcionada.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Odontologia da PUCRS em nome do Prof^o Dr. José Antônio Poli de Figueiredo, pelas oportunidades proporcionadas durante a realização do Curso de Mestrado.

À Faculdade de Farmácia, pela utilização das dependências do Vivário e ao funcionário Juliano Soares pela preciosa orientação quanto ao manejo e cuidados dos animais.

Ao Instituto de Toxicologia da PUCRS, pela utilização das dependências para a realização dos experimentos com animais.

À Prof^a Dr^a Maria Ivete Bolzan Rockenbach, pela orientação durante a obtenção das imagens radiológicas.

À Dr^a Ana Maria Gaiger pelo processamento das amostras, confecção das lâminas, auxílio na avaliação histológica.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da PUCRS, pela generosidade em dividir seus conhecimentos, que tanto contribuíram para meu aperfeiçoamento profissional.

Aos queridos colegas de Mestrado e Doutorado da Área de Endodontia, pela amizade e apoio durante os dois anos de curso.

À CAPES, pelo apoio financeiro disponibilizado através da bolsa, indispensável para a realização deste curso.

“In pulp biology, or in endodontology, opinions may differ, but only cells distinguish between facts and fiction.”

Kaare Langeland

RESUMO

Objetivos: Avaliar a eficácia da associação de um inibidor de bomba de prótons (omeprazol) com Ca(OH)_2 , como medicação intracanal em dentes de ratos com lesões periapicais.

Métodos: As lesões periapicais foram induzidas pela abertura do primeiro molar inferior direito de 36 ratos Wistar, machos (seis por grupo); as cavidades foram deixadas abertas por 28 dias. Após esse período, o canal distal de cada dente foi preparado, preenchido com as respectivas medicações (Controle Negativo - PEG 400; Controle Positivo - Ca(OH)_2 + PEG 400; Teste - Ca(OH)_2 + Omeprazol + PEG 400) e seladas com amálgama por 15 ou 28 dias. As amostras microbiológicas foram coletadas em três períodos: S1 - após 28 dias de indução da lesão; S2 - após o preparo biomecânico; S3 - após 15 ou 28 da medicação. Os animais foram eutanasiados e os dentes processados para análise radiográfica e histológica.

Resultados: Foi observado, por meio de análise radiográfica e histológica, que em ambos os grupos teste e controle positivo ocorreu uma redução das áreas de lesão periapical, em 28 dias, quando comparados ao grupo controle negativo. A redução das lesões periapicais e do infiltrado de células inflamatórias foi significativamente maior com a associação de omeprazol ao Ca(OH)_2 , sendo observada uma maior área de reparo ósseo. A avaliação microbiológica mostrou uma diminuição significativa na contagem de UFC de S1 para S2 ou S3, mas não houve diferença nem entre os períodos de tempo S2 e S3, nem entre os grupos experimentais em S3, em 15 ou 28 dias de medicação. Entretanto, a caracterização bacteriana revelou uma possível atividade seletiva dos medicamentos, apesar dos resultados semelhantes na contagem de UFC.

Conclusões: Nossos dados mostram que a associação de omeprazol ao Ca(OH)_2 favoreceu um padrão de reparo superior das lesões periapicais induzidas em ratos, além de parecer apresentar uma atividade seletiva sobre a microbiota endodôntica, quando comparada ao Ca(OH)_2 utilizado de forma isolada.

DESCRITORES¹

Hidróxido de cálcio, inibidor de bomba de prótons, lesão periapical, omeprazol.

¹ DeCS – Descritores em Ciencia da Saúde, disponível em <http://decs.bvs.br>

ABSTRACT

Objectives: To evaluate the efficacy of the association of a proton pump inhibitor (omeprazole) with Ca(OH)_2 as intracanal medication in a rat model of periapical lesions.

Methods: Periapical lesions were induced on the first right mandibular molar of male Wistar rats (6 per group) and left open in the oral cavity for 28 days. After that period, the distal canal of each tooth was prepared, filled with the respective dressing (Negative Control - PEG 400; Positive Control - Ca(OH)_2 + PEG400; Test - Ca(OH)_2 + Omeprazole + PEG 400), and sealed with amalgam for 15 or 28 days. Microbiological samples were taken in three periods: S1 - after 28 days of lesion induction; S2 - after the biomechanical preparation; S3 - after the abovementioned medication periods (15 and 28 days). The animals were euthanized, and the teeth were processed for radiographic and histological analysis.

Results: The radiographic and histological analysis revealed that both test and positive control groups had a reduction of periapical lesion areas, at 28 days, when compared to the negative control group. The reduction of periapical lesions and of inflammatory cells infiltration was significantly improved by associating omeprazole to Ca(OH)_2 , with a visible increase of reparative bone areas. The microbiological assessment showed a significant decrease of CFU counting from S1 to S2 or S3 collecting times, but no differences were observed between the S2 and the S3 time-periods, or among the experimental groups within the S3 period, either at 15 or 28 days of medication. However, further bacterial characterization showed a possible selective activity of the medications, despite the similar CFU count results.

Conclusions: Our data showed that association of omeprazole to Ca(OH)_2 favored a superior repair of periapical lesions in rats, and seems to display different selective activity over the endodontic microbiota, in comparison to the conventional Ca(OH)_2 dressing.

DESCRIPTORS²

Calcium hydroxide, omeprazole, periapical lesion, proton pump inhibitor.

² MeSH – Medical Subject Headings, available at: www.nlm.nih.gov/mesh

LISTA DE FIGURAS E IMAGENS

Imagem 1 – Estrutura química do primeiro inibidor da bomba de prótons, omeprazol	20
Figure 1 – Comparison of the effects of Ca(OH) ₂ and Ca(OH) ₂ associated with omeprazole on the size of periapical lesions in rats: radiographic analysis	44
Figure 2 – Comparison of the effects of Ca(OH) ₂ and Ca(OH) ₂ associated with omeprazole in the rat model of periapical lesions: microbiological analysis.....	45
Figure 3 – Comparison of the effects of Ca(OH) ₂ and Ca(OH) ₂ associated with omeprazole in the rat model of periapical lesions: histological analysis.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS

Ca(OH)₂ - hidróxido de cálcio;

CCCP - carbonil cianido m-clorofenilidrazona;

c-fos - fator de transcrição de calcitonina;

CTR - receptor de calcitonina;

E. faecalis - *Enterococcus faecalis*;

EDTA – ácido etilenodiamino tetra- acético;

fMLP - N-formil-metionil-leucil-fenilalanina;

H. pylori - *Helicobacter pylori*;

H⁺ - íon hidrogênio;

K⁺ - íon potássio;

K⁺/Na⁺-ATPase - enzima potásio/sódio-ATPase (enzima da bomba de prótons);

kVp – quilovoltagem pico;

mA – miliampere;

MMP-9 - metaloproteinase de matriz 9;

Na⁺ - íon sódio;

NFATc1 - fator nuclear citoplásmico 1 de células T ativadas;

OPG/RANKL - osteoprotegerina/receptor ativador do ligante NF-κB;

PEG 400 - polietilenoglicol 400;

PPI - inibidor de bomba de prótons;

ROS - espécies reativas de oxigênio;

CFU (UFC) - unidade formadora de colônias.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	14
OBJETIVOS.....	22
<i>Objetivo geral.....</i>	<i>23</i>
<i>Objetivos específicos.....</i>	<i>23</i>
ARTIGO DE PESQUISA.....	24
<i>Abstract.....</i>	<i>27</i>
<i>Introduction.....</i>	<i>29</i>
<i>Material and Methods.....</i>	<i>31</i>
<i>Results.....</i>	<i>34</i>
<i>Discussion.....</i>	<i>36</i>
<i>References.....</i>	<i>39</i>
<i>Legend to figures.....</i>	<i>43</i>
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50
ANEXOS.....	56
<i>ANEXO A – Carta de aprovação pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia – PUCRS.....</i>	<i>57</i>
<i>ANEXO B – Carta de aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais – PUCRS.....</i>	<i>58</i>
<i>ANEXO C – Submissão do artigo de pesquisa ao periódico Journal of Endodontics.....</i>	<i>59</i>

Introdução

INTRODUÇÃO

O estudo clássico de Kakehashi et al., de 1965 (1), onde foram comparados ratos *germ-free* com ratos convencionais, comprovou que a existência de bactérias é uma das principais razões para a ocorrência de necrose pulpar e lesão periapical. Essa infecção do canal radicular é constituída por uma rica microbiota, com até doze espécies distintas, que inclui bactérias anaeróbias estritas e facultativas (2). Durante o curso da infecção, ocorre uma mudança na relação entre as bactérias e a variedade de espécies microbianas diminui, havendo um domínio das anaeróbias estritas. Essa mudança se dá principalmente pela alteração da disponibilidade e demanda de nutrientes e os microrganismos que sobrevivem a este ambiente, cada vez mais deficiente em nutrientes, são os de maior virulência (3-5).

Nos casos de necrose pulpar com lesão periapical, há uma maior organização das bactérias, caracterizando o biofilme bacteriano, além de ocorrer a penetração destas nos canalículos dentinários. Segundo Love e Jenkinson (6), a penetração bacteriana nos túbulos dentinários é maior quando o cimento encontra-se reabsorvido, o que é comum em casos de dentes com lesão periapical, e, dessa forma, as bactérias podem alcançar toda a extensão dos canalículos se tornando ainda mais difíceis de serem eliminadas.

Dentre as causas de insucesso dos tratamentos endodônticos, acredita-se que a principal seja a permanência de microrganismos na porção apical do canal radicular (5,7-9). Em dentes tratados endodonticamente e com lesão periapical persistente, ocorre a proliferação de uma a duas espécies bacterianas (10), sendo a maioria delas anaeróbias facultativas Gram-positivas (11,12), pertencentes aos gêneros *Actinomyces*, *Enterococcus* e/ou *Propionibacterium* (5). O *Enterococcus faecalis* é o principal destes patógenos oportunistas, estando comumente associado aos casos de insucesso do tratamento (3,7,13,11). Embora o *E. faecalis* possua diversos fatores de virulência, sua capacidade de causar doença

periapical se dá pela capacidade de sobreviver aos efeitos do tratamento endodôntico, persistindo no canal radicular e túbulos dentinários (14,15); nestes casos, torna-se de difícil eliminação, mesmo após o retratamento endodôntico (10). Essa capacidade do *E. faecalis* em sobreviver, em estado metabólico mínimo, por longos períodos de tempo sem nutrientes nos canais obturados, é um importante fator na patogenicidade e manutenção de uma infecção persistente após o tratamento endodôntico (16).

Quando uma bactéria encontra desafios para sobreviver, como o que acontece durante as diversas fases do tratamento endodôntico, uma resposta adaptativa ao estresse é desencadeada (17). No caso do *E. faecalis*, por exemplo, ocorre um aumento da síntese de proteínas induzidas por estresse, que protegem a bactéria de condições adversas, como altas temperaturas e falta de glicose, facilitando sua recuperação quando em condições mais favoráveis (16). Em 2002, Evans et al. (7) realizaram um estudo com a exposição *in vitro* de *E. faecalis* a concentrações sub-letais de hidróxido de cálcio, com ou sem vários pré-tratamentos (incluindo o inibidor da bomba de prótons CCCP – carbonil cianido m-clorofenilidrazona). Foi observado que não houve diferença na sobrevivência de células quando se bloqueou a síntese protéica; entretanto, quando se adicionou o CCCP, houve uma redução significativa das células viáveis de *E. faecalis*, ou seja, quando estas foram expostas por 30 min ao hidróxido de cálcio com pH 11,1, na presença de CCCP, ocorreu 20 vezes mais morte celular, em comparação com a mesma exposição ao hidróxido de cálcio sem o inibidor da bomba de prótons. Segundo os autores, portanto, quando o desafio é sobreviver em um meio alcalino, como na presença de medicação intracanal à base de hidróxido de cálcio, a principal tática de sobrevivência é a utilização de uma bomba de prótons funcional existente na sua membrana celular, capaz de manter a homeostase do citoplasma bacteriano, mesmo em ambientes com pH em torno de 11,5.

O balanço entre prótons e íons hidroxila é de grande importância para a homeostase celular (18,19) e o crescimento microbiano (20). Existem diversos mecanismos para manter a homeostase do pH, como transportadores de K^+ e Na^+ , que contribuem para o fluxo de íons que mantém o balanço de prótons e, múltiplas enzimas catabólicas que consomem e geram prótons (18, 20). Em células fúngicas, por exemplo, esse fluxo é mediado por transportadores de cátions/ H^+ e enzimas K^+/Na^+ -ATPases (19). Embora diversos mecanismos predominem em determinadas espécies, como o transporte de H^+/Na^+ em bacilos alcalófilos, vários mecanismos de transporte de fluxo transmembrana podem ser observados em microrganismos com pH adaptável (20). Além dos mecanismos conhecidos, uma bomba de efluxo é reconhecidamente responsável pela resistência de várias espécies às drogas antibacterianas, principalmente nas bactérias Gram-negativas (21, 22).

Segundo Lomovskaya et al. (23), bombas de efluxo podem ser consideradas como alvos antibacterianos potenciais e o desenvolvimento de inibidores dessas bombas efetivos contra bactérias é altamente necessário. Acredita-se que estas moléculas possam diminuir a resistência intrínseca das bactérias aos antibióticos, reverter a resistência adquirida (mesmo de cepas altamente resistentes) e, reduzir a frequência de surgimento de mutações que conferem resistência aos antibióticos existentes.

O *E. faecalis* é altamente resistente aos medicamentos usados durante a terapia endodôntica, não só por sua resposta adaptativa em situações de estresse, mas também por sua capacidade de penetrar nos túbulos dentinários, alcançando grandes profundidades, onde é, obviamente, mais difícil de ser alcançado e eliminado por qualquer irrigante ou medicação intracanal (14-16).

O hidróxido de cálcio, que constitui atualmente o curativo de demora mais utilizado na clínica endodôntica, embora apresente inicialmente um pH maior do que 12, sofre alterações de pH ao longo de toda a extensão do canal e, especialmente nos túbulos

dentinários, não ultrapassando o valor de 11,3. Isto se dá, principalmente, pela capacidade tamponante da dentina (24-26).

Considerando-se que as medicações à base de hidróxido de cálcio não conseguem manter um pH alto o suficiente para eliminar a grande maioria das bactérias mais resistentes presentes no canal radicular e nos túbulos dentinários, seria racional pensar na utilização de uma medicação que limitasse a capacidade destas bactérias de sobreviver em um meio altamente alcalino. Neste contexto, compostos com a capacidade de inibir a ação da bomba de prótons da membrana bacteriana, que regula o pH interno da bactéria, poderiam potencializar os efeitos terapêuticos do hidróxido de cálcio, aumentando as probabilidades de eliminação das mesmas.

Atualmente, existem cinco diferentes inibidores da bomba de prótons, que são usados clinicamente, comumente por via oral, para o tratamento de diversas desordens gastrintestinais, incluindo refluxo gastro-esofágico e úlceras pépticas ou duodenais. Estes inibidores são todos compostos benzimidazólicos, representados pelo omeprazol, seu S-isômero - o esomeprazol, além do lansoprazol, do rabeprazol e do pantoprazol. Embora apresentem propriedades farmacológicas e eficácia semelhantes, as principais diferenças entre esses fármacos residem nos grupamentos químicos piridina ou benzimidazol (27,28).

Os inibidores farmacológicos da bomba de prótons são pró-drogas ácido-lábeis, que precisam de proteção contra o ácido gástrico, para evitar que sofram transformação antes de alcançarem seu sítio de ação. No caso dos seus efeitos como supressores da secreção de ácido gástrico, após serem absorvidos na circulação sistêmica, difundem-se nas células parietais do estômago, sendo acumulados nos canalículos secretores de ácidos, onde são ativados, formando uma sulfenamida tetracíclica catalisada por prótons. Esta forma ativada, por sua vez, liga-se de modo covalente a grupos sulfidríla de cisteínas na enzima H^+K^+ -ATPase, o que causa a inativação irreversível da bomba. A secreção de ácido só retorna após a síntese

de novas moléculas da bomba e sua inserção na membrana luminal das células parietais, proporcionando, dessa forma, uma supressão prolongada da secreção ácida, que pode durar até 48 h. Estima-se que em doses convencionais, os inibidores da bomba de prótons sejam capazes de reduzir, entre 90 e 98%, a secreção de ácidos até 24 h. O omeprazol também apresenta efeito inibitório sobre a anidrase carbônica da mucosa gástrica, o que pode contribuir para a supressão da produção de ácido (28-31).

O omeprazol foi o primeiro inibidor da bomba de prótons a ser desenvolvido (Imagem 1). É altamente lipofílico, ou seja, penetra facilmente na membrana celular. Constitui uma base fraca (se concentra em compartimentos ácidos) e, é muito instável em solução ácida. Representa uma mistura racêmica da qual podem ser isolados os isômeros R- e S-. Em nível celular, estes isômeros são capazes de produzir uma redução semelhante da secreção do ácido gástrico. Entretanto, o S-isômero (esomeprazol) tem um metabolismo mais lento, o que resulta em uma maior concentração plasmática, garantindo dessa forma, uma inibição mais efetiva e prolongada da produção de ácido (27, 32, 33).

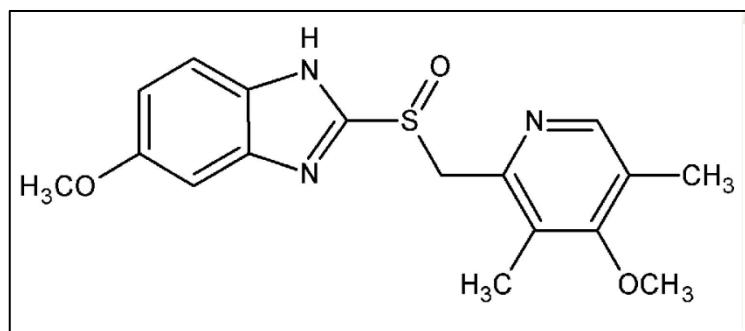


Imagem 1 – Estrutura química do primeiro inibidor da bomba de prótons, omeprazol (<http://www.ucl.ac.uk>)

Os inibidores da bomba de prótons são usados juntamente com antibióticos, no tratamento de úlcera péptica de origem microbiana, ou seja, na presença de *Helicobacter pylori*. As combinações mais utilizadas compreendem um inibidor da bomba de prótons em associação com os antibióticos amoxicilina e metronidazol. Em alguns esquemas, a

claritromicina é utilizada em substituição à amoxicilina. A inibição da produção de ácido gástrico aumenta a estabilidade dos fármacos antibióticos, levando a um maior acúmulo dos mesmos no suco gástrico, além de potencializarem a sensibilidade do *H. pylori* aos antibióticos, diminuindo as concentrações inibitórias mínimas. Os inibidores da bomba de prótons, por si só, não são capazes de eliminar o *H. pylori*, mas apresentam algumas propriedades antimicrobianas reconhecidas, embora o mecanismo para estes efeitos ainda não esteja bem esclarecido (29, 31, 34, 35). Segundo Andersen et al. (36), o *H. pylori* também possui uma bomba de prótons e o omeprazol pode ter um efeito direto sobre ela.

Atualmente, muitos estudos têm avaliado a atividade anti-inflamatória dos fármacos inibidores da bomba de prótons (37-39). Segundo Kedida et al. (39), os PPIs atuam sobre a migração de neutrófilos induzida por N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP) e interleucina-8, têm efeitos anti-oxidativos, por exemplo, reduzindo a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), além de inibirem a produção de citocinas pró-inflamatórias responsáveis pelo influxo de células inflamatórias para o tecido. De forma relevante, foi demonstrado que o omeprazol é capaz de inibir a reabsorção óssea *in vitro* (40). Ademais, um trabalho recente (41) demonstrou que a incubação *in vitro* de omeprazol produziu uma redução da expressão de diversos fatores envolvidos na reabsorção óssea, incluindo o fator de transcrição (c-fos), o receptor de calcitonina (CTR), o fator nuclear citoplásmico 1 de células T ativadas (NFATc1) e a metaloproteinase de matriz 9 (MMP-9), aliada a um aumento dos níveis de osteocalcina e da relação osteoprotegerina/receptor ativador do ligante NF-κB (OPG/RANKL). Estes dados são indicativos de que o omeprazol pode influenciar o metabolismo ósseo, através de uma inibição da atividade dos osteoclastos e uma estimulação dos osteoblastos.

Quanto à segurança, os inibidores da bomba de prótons apresentam um perfil toxicológico altamente favorável, quando utilizados por via oral (omeprazol, esomeprazol,

lanzoprazol, rabeprazol e pantoprazol), ou mesmo, após a administração endovenosa (pantoprazol) (28,29). Estes dados são de extrema importância e muito promissores para a condução de novos estudos e, ainda para a caracterização de novas aplicações terapêuticas para este grupo de medicamentos.

As medicações intracanal são utilizadas como estratégias auxiliares na desinfecção endodôntica, buscando a redução ou eliminação das bactérias localizadas no interior do sistema de canais radiculares, criando um ambiente que favoreça o reparo dos tecidos periapicais. Considerando os mecanismos de resistência apresentados por certas espécies bacterianas ao tratamento endodôntico e, especialmente, a capacidade de algumas espécies bacterianas em produzir uma bomba de prótons ligada à membrana celular, o presente trabalho teve como objetivo principal verificar se a associação do inibidor da bomba de prótons, o omeprazol, poderia aumentar a eficácia do hidróxido de cálcio como medicação intracanal, sobre bactérias reconhecidamente resistentes ao tratamento endodôntico e, normalmente relacionadas aos casos de insucesso.

A relevância do presente estudo reflete-se no fato de que, até o momento, não há uma medicação intracanal considerada totalmente eficaz para o tratamento das lesões apicais. Assim, a realização de novas pesquisas para elucidar a efetividade antimicrobiana e os mecanismos de ação das diferentes substâncias no interior do sistema de canais radiculares é de grande relevância, sendo importante avaliar os efeitos de associações medicamentosas, bem como, a utilização de novas substâncias na terapia endodôntica.

Objetivos

OBJETIVOS

Objetivo geral

O presente estudo teve como objetivo avaliar a eficácia do emprego de inibidor da bomba de prótons (omeprazol), associado à pasta de hidróxido de cálcio, como medicação intracanal em dentes de ratos com lesão periapical.

Objetivos específicos

a. Analisar radiograficamente a eficácia da associação do omeprazol à pasta de hidróxido de cálcio sobre o reparo de lesões periapicais em ratos;

b. Avaliar o efeito antimicrobiano do omeprazol, associado à pasta de hidróxido de cálcio, em canais radiculares de ratos com lesão periapical;

c. Avaliar a resposta histológica dos tecidos periapicais de dentes de ratos, após a utilização de omeprazol, associado à pasta de hidróxido de cálcio, como medicação intracanal.

Artigo de Pesquisa

ARTIGO DE PESQUISA

O artigo a seguir intitula-se “***In vivo* study on the effectiveness of the proton pump inhibitor omeprazole associated to calcium hydroxide as intracanal medication**” e foi submetido ao periódico *Journal of Endodontics* (Fator de impacto 2,727; Qualis A1 Internacional, Área de Odontologia, CAPES).

Title: Effectiveness of the proton pump inhibitor omeprazole associated to calcium hydroxide as intracanal medication: an *in vivo* study.

Author names and affiliations: Cláudia Wagner¹, Valdir Cristóvão Barth Júnior², Sílvia Dias de Oliveira², Maria Martha Campos^{1,3}.

¹Postgraduate Program of Dental College, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul - PUCRS, Porto Alegre, Brazil; ²Laboratory of Immunology and Microbiology, Faculty of Biosciences - PUCRS; ³Institute of Toxicology, PUCRS.

Corresponding Author: Maria Martha Campos, School of Dentistry, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Avenida Ipiranga, 6681, Partenon, 90619-900, Porto Alegre, Brazil. Phone number: 55 51 3320 3562; Fax number: 55 51 3320 3626; E-mail: camposmartha@yahoo.com; maria.campos@pucrs.br

Abstract

Objectives: To evaluate the efficacy of the association of a proton pump inhibitor (omeprazole) with $\text{Ca}(\text{OH})_2$ as intracanal medication in a rat model of periapical lesions.

Methods: Periapical lesions were induced on the first right mandibular molar tooth of 36 male Wistar rats (6 per group). After 28 days, the distal canal of each tooth was prepared, filled with the respective dressing (Negative Control group - PEG 400; Positive Control group - $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + PEG400; Test group - $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + Omeprazole + PEG 400), and sealed with amalgam for 15 or 28 days. Microbiological samples were taken in three periods: S1 - after 28 days of lesion induction; S2 - after the biomechanical preparation; S3 - after the medication (15 and 28 days).

Results: The radiographic and histological analysis revealed that either $\text{Ca}(\text{OH})_2$ or $\text{Ca}(\text{OH})_2$ plus omeprazole dressings produced a reduction of periapical lesions, at 28 days, when compared to the negative control group. The reduction of periapical lesions and inflammatory cells infiltration was visible improved by associating omeprazole to $\text{Ca}(\text{OH})_2$, with an increase of reparative bone areas. The microbiological assessment showed a significant decrease of CFU counting from S1 to S2 or S3 collecting times, but no differences were observed between the S2 and the S3 time-periods, or among the experimental groups within the S3 period. Further bacterial characterization showed a possible selective activity of the medications.

Conclusions: Our data showed that association of omeprazole to $\text{Ca}(\text{OH})_2$ favored a superior repair of rat periapical lesions, and seemed to display different selective activity over endodontic microbiota, in comparison to the conventional $\text{Ca}(\text{OH})_2$ dressing.

Keywords

Omeprazole, proton pump inhibitor, calcium hydroxide, intracanal medication, induced periapical lesion.

Abbreviations

Ca(OH)₂ - calcium hydroxide; **PPI** - proton pump inhibitor; ***E. faecalis*** - *Enterococcus faecalis*; ***H. pylori*** - *Helicobacter pylori*; **fMLP** - N-formyl-methionine-leucine-phenylalanine; **ROS** - reactive oxygen species; **CTR** - calcitonin receptor; **NFATc1** - nuclear factor of activated T-cells cytoplasmic 1; **MMP-9** - matrix metalloproteinase - 9; **OPG/RANKL** - osteoprotegerin/receptor activator of NF-κB ligand; **PEG 400** –polyethylene glycol 400; **EDTA** – ethylenediaminetetraacetic acid.

Introduction

The classical study conducted by Kakehashi et al (1), clearly attested that existence of bacteria is the major reason for pulp necrosis and consequent periapical lesion. Additionally, the permanence of microorganisms in the apical portion of the root canal is considered to be the main cause of endodontic treatment failure (2-4). In humans, *Enterococcus faecalis* is one of the most important of these pathogens (3,5), due to its ability to survive under adverse conditions, even following the root canal treatment (6,7). According to Evans et al (3), when the challenge is to survive in an alkaline medium, as in the presence of calcium hydroxide dressings, the main tactic of *E. faecalis* is to use an existing functional proton pump in their cell membrane, capable of maintaining the homeostasis of the cytoplasm, even in a pH around 11.5. Ca(OH)₂ has an initial pH of approximately 12, but these values do not commonly exceed 11 throughout the entire length of the canal, especially in the tubules, because of the dentin buffering capacity (8).

The proton pump inhibitors (PPIs) are used in association with antibiotics to treat peptic ulcer disease of microbial origin (in the presence of *Helicobacter pylori*). Omeprazole was the first PPI to be developed; it is a highly lipophilic weak base, which easily cross the cell membrane (9,10). The PPIs are unable to eliminate *H. pylori* when used alone, but they have recognized antimicrobial properties, although the mechanisms for these effects remain elusive (11,12). According to Andersen et al (13), *H. pylori* possess a proton pump, and omeprazole might display a direct effect on it. Furthermore, some studies have evaluated the anti-inflammatory activities of PPIs (14-16). As stated by Kedika et al (14), they inhibit neutrophil migration and the formation of reactive oxygen species (ROS), besides inhibiting the production of pro-inflammatory cytokines. Importantly, it was shown that omeprazole is able to inhibit bone resorption *in vitro* (15). Likewise, a recent study (16) demonstrated that *in vitro* incubation of omeprazole significantly decreased the expression of several

transcription factors involved in bone resorption, including CTR, c-fos, NFATc1 and MMP-9, accompanied by an increase of osteocalcin levels and OPG/RANKL ratio.

Considering the mechanisms of resistance shown by certain bacterial species in endodontics, and especially the ability of some bacterial species to express a proton pump linked to the cell membrane, the aim of this study was to verify whether the association of the potent PPI omeprazole, could increase the effectiveness of calcium hydroxide as intracanal medication in a rat model of periapical lesions.

Material and Methods

Animal model of periapical lesions

Thirty-six Male Wistar rats (160 – 180 g body weight, 6 animals per group) were used. The experimental protocols were approved by the local Animal Ethics Committee (Protocol Number 10/00164), and the animals were maintained following the Guide to Management and Use of Experimental Animals, National Institutes of Health (NIH), EUA.

Periapical lesions were induced as described previously, with minor adaptations (17). On day 0, each rat was anesthetized by an intraperitoneal injection of xylazine (10 mg/kg) combined to ketamine (100 mg/kg). Pulp exposure was performed at the distal fossa of the right mandible first molar tooth, using a #1011 diamond round bur to the depth of bur diameter, followed by instrumentation of the distal canal with #10 K-file endodontic instrument, under irrigation with sterilized saline solution 0.85%. The exposed pulps were left open to the oral environment to allow the formation of periapical lesions for 28 days (18).

Intracanal medications

The pastes were prepared at the moment of application in a glass plaque by using a #24 spatula, with Polyethylene glycol 400 (PEG 400; Merck) as vehicle. The intracanal dressings were prepared according to the following experimental groups: Negative Control group - PEG 400; Positive Control group - calcium hydroxide (P.A. 96%; Merck; 2 mg) in PEG 400; Test group - calcium hydroxide and omeprazole (1:1; omeprazole 8.5% - Quinta Essência, Porto Alegre, Brazil) in PEG 400 (4 ml).

Procedures for root canal preparation

On day 28, the rats were re-anesthetized and the distal root canals were instrumented up to the #30 K-file, with sodium hypochlorite 1% as irrigating solution (in a final volume of

200 µl), followed by EDTA 17 % for 3 min, and a final wash using sterilized saline solution. Subsequently, the canals were dried with #25 sterilized paper points, and completely filled with the intracanal medications, according to the experimental group, employing a #15 K-file, and sealed with amalgam. The animals were euthanized following 15 or 28 days after the application of intracanal medications, by deep anesthesia with isoflurane.

Microbiological Analysis

The microbiological sample collections were made with #25 sterilized paper points and sterilized saline solution, at 3 different periods: S1 - day 28, before the endodontic treatment; S2 - day 28, after the endodontic treatment; S3 - days 43 or 56, after euthanasia. In the S3, the samples were obtained after removal of the jaw area corresponding to the right molars. Both the amalgam restoration and the intracanal medication were removed. Then, the root canal was filled with saline solution, the canal walls were scraped with a #25 file, and the samples were collected. In all cases, the absorbent paper points were aseptically transferred to 1.5 ml microcentrifuge tubes, containing 1 ml of sterile saline solution and agitated by vortexing, in order to suspend attached bacteria into the solution. To estimate the number of Colony Forming Units per milliliter (CFU/ml), serial decimal dilutions (up to 10^{-3}) were prepared. Aliquots of 100 µl of each dilution and the original suspension were spread onto the surface of Blood Agar, in duplicate, and incubated aerobically at 37°C for 24 h.

To further analyse the microbiota after 28 days of medication, the samples were characterized according to Gram staining, catalase activity and bacteria morphotype.

Radiographic analysis

The jaws were dissected (19) and processed for imaging as described previously (20). Briefly, the radiographs were taken, in a standardized manner (70 kVp, 7 mA, 30 cm focus/film distance, and 0.2 s exposure time), using the DenOptix™ system (Gendex®, Des

Plaines, IL). The areas of periapical lesions were determined in mm², using the Adobe® Photoshop® CS5 software (Adobe Systems Incorporated, San Jose, CA), considering an image resolution of 11.8 pixels/mm².

Histological Analysis

After imaging, the mandibles were fixed in 4% paraformaldehyde at 4°C for 48 h, decalcified with 14% EDTA (pH 7.1), and embedded in paraffin wax. Blocks containing the root and the periapical tissues were prepared in 6 µm serial sections. All sections were stained with hematoxylin and eosin, observed under a light microscope, and the significant histological findings were described, considering inflammatory and repair parameters.

Statistical Analysis

The results were expressed as mean ± standard error mean of 6 animals in each experimental group. The sample size was established on the basis of previous literature studies data (21,22), and by using the statistical program GraphPad InStat (GraphPad Software Inc., San Diego, EUA), for P<0.05. Data were subjected to analysis of variance (one-way ANOVA) followed by Newman-Keuls *post-hoc* test. Frequency data was analyzed by means of Fisher's exact test. P values less than 0.05 were considered statistically significant.

Results

Radiographical analysis

Data depicted in Fig. 1A shows that either Ca(OH)_2 or Ca(OH)_2 plus omeprazole dressings failed to significantly affect the size of periapical lesions, according to the radiographic assessment, at 15 days ($P > 0.05$). Otherwise, the Fig. 1B reveals that both Ca(OH)_2 and Ca(OH)_2 plus omeprazole intracanal dressings produced a striking reduction of periapical lesion areas ($P < 0.05$ and $P < 0.001$, respectively), when evaluated at 28 days. Of note, the reduction of periapical lesions was significantly improved by associating the PPI omeprazole to Ca(OH)_2 ($P < 0.05$). Representative radiographic takings showing the effects of intracanal medications at 28 days of evaluation are provided in the Fig. 1 (C to E), showing a very favorable profile of healing in the Ca(OH)_2 plus omeprazole group.

Microbiological Analysis

The first microbiological sample collection (S1) had a higher CFU counting, when compared to the S2 and S3 time-points in all experimental groups (Fig. 2). However, on either 15 (Fig. 2A) or 28 (Fig. 2B) days of intracanal medication, there were no significant differences in the CFU counts between the S2 and the S3 time-periods. Considering the lack of effect of both Ca(OH)_2 and Ca(OH)_2 plus omeprazole on the total CFU counts, we decided to perform additional microbiological analysis of S3 collection samples, after 28 days of intracanal medication. As it can be observed, Ca(OH)_2 combined to omeprazole interfered on catalase positive bacteria percentage, when compared to control and Ca(OH)_2 groups (Fig. 2D). Regarding the Gram staining, it was possible to observe an inhibitory effect on Cocci Gram-positive bacteria in the Ca(OH)_2 group, in relation to the control or the Ca(OH)_2 plus omeprazole groups (Fig. 2C and results not shown).

Histological analysis

Histologically, after 28 days of intracanal dressing, bone resorption associated with prominent infiltration of inflammatory cells was noted in the periapical tissue of the control group (Figure 3A), and multiple resorption lacunae containing multinucleated osteoclasts were detected (Figure 3D). Minimal inflammatory cell infiltration was observed in the groups treated with Ca(OH)_2 , or Ca(OH)_2 associated with omeprazole (Fig. 3B and C), with the presence of neovascularization areas (Fig. 3E). Visible areas of reparative bone formation in the periapical region were observed when Ca(OH)_2 plus omeprazole combination was employed, in relation to the Ca(OH)_2 group (Fig. 3F).

Discussion

Calcium hydroxide is the most common intracanal medication, and displays well-known antimicrobial effects (23,24); however, this agent has some limitations (8,25). According to Tang et al (26) there are three major reasons for bacterial survival and growth despite the use of Ca(OH)₂ dressings: (i) the capacity of some bacteria to survive in dentinal tubules and ramifications; (ii) the pH in the canal reaches neutral levels after a rapid use of all Ca(OH)₂; and (iii) the microleakage of the temporary filling.

In pulpal necrosis, the bacterial penetration in the dentinal tubules is higher when the cement is reabsorbed (27), a common process observed in teeth with periapical lesions (28), and therefore the elimination of microorganisms and the effectiveness of intracanal medications can be compromised.

In the present study, we decided to investigate the effects of associating the PPI drug omeprazole to Ca(OH)₂, in the rat model of periapical lesions. The usefulness of the rat model to emulate human endodontic lesions has been well established (18). Most studies have used this model to evaluate the effect of systemic medications on endodontic lesions (28), as well as to assess some of the mechanisms involved in the pathogenesis of periapical lesions, such as the involvement of p38 MAPK (21) or platelet-derived growth factor-C (30). However, the use of the rat model to analyze intracanal dressings, as presented in our study, has not been fully characterized before. Furthermore, the association of omeprazole has never been tested in endodontics, therefore this study was designed considering previous evidence on the relevance of a proton pump for the survival of bacteria resistant to endodontic treatment (3), as well as in the current therapy of gastric ulcers associated to *H. pylori* infection, where PPI act not only reducing the acid secretion, but also increasing the bacterial sensitivity to the antibiotics (12,13).

The antimicrobial effect of Ca(OH)₂ is mostly related to the release and diffusion of hydroxyl radicals (26,31), and the velocity of this release depends on the vehicle where it is

manipulated (32). When Ca(OH)_2 is prepared in a more viscous vehicle, i.e. PEG 400, as used in our study, the ion release is slower than that observed when an aqueous vehicle is employed (33). This fact could explain our more favorable results, for either Ca(OH)_2 or its association with omeprazole in the 28 days medication regimen, than in 15 days, when analyzing both radiographic and histological results. Thus, it is also relevant to consider the time necessary for tissue healing to be radiographically visible. Where in humans 6 months is the time commonly needed, in rats, the period of 28 days was enough to show great differences among the experimental groups, and the evident tissue healing, especially in the Ca(OH)_2 plus omeprazole group. This feature was also confirmed by the histological analysis which revealed a favorable evolution of periapical lesions at 28 days, in either test groups, with greater areas of reparative bone formation in the omeprazole group. However, the same was not observed when considering the microbiological analysis. Our data showed a significant reduction in CFU counting, in all experimental groups, from S1 to S2 time-points.

Notwithstanding, there was no significant differences in the CFU counts between S2 and S3 periods. These results agree with previous studies that evidenced an increase in the CFU counting after intracanal medication (26,34). This could be explained by several reasons, including failures of sealing, rapid inactivation of the medication and resistant bacteria, but also by methodological limitations inherent to our study. For instance, the aerobic incubation of the samples does not favor the cultivation of anaerobic bacteria. Furthermore, the paper point technique might not be the most accurate way of sampling the endodontic microbiota, although this method has been found effective for endotoxin sampling in a recent study in humans (35).

Furthermore, it is important to consider a possible selective action of the intracanal dressings on bacteria. For this reason, we decided to further categorize the bacteria in our model by determining morphotype, catalase activity and Gram staining. Our data on this

experimental approach showed that the bacterial profile in the group in which Ca(OH)₂ was associated to omeprazole is rather distinct from that seen in either negative or positive control groups. This allow us to infer that by some means, the association of omeprazole to Ca(OH)₂ is able to induce bacterial selection, likely favoring the repair observed in this experimental group, supporting radiographic and histological data.

Interestingly, some recent pieces of evidence (14-16) have demonstrated clear anti-inflammatory and pro-reparative effects for PPI drugs, such as omeprazole, what might help to explain our radiographic and histological findings, which indicate a more efficient healing of the periapical tissue in the Ca(OH)₂ plus omeprazole group. Therefore, data obtained in the present study, by using the combination of Ca(OH)₂ and omeprazole, could be explained not only by bacterial elimination, but also by the anti-inflammatory and pro-reparative effects of omeprazole. Therefore, our results for this new intracanal dressing are promising for the endodontic clinical setting. However, it remains clear that more studies are necessary to determine other concentrations of omeprazole, alternative formulations, and also to perform further microbiological characterization.

Acknowledgements

CW is a mastership student receiving grants from CAPES (Modality 2, Brazil).

References

1. Kakehashi 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* 1965;20:340-9.
2. Nair PNR. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004;15:348–81.
3. Evans M, Davies JK, Sundqvist G, et al. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *Int Endod J* 2002;35:221–228.
4. Siqueira Jr JF. Microbial causes of endodontic flare-ups. *Int Endod J* 2003;36:453-63.
5. Roças IN, Siqueira Jr JF, Santos KRN. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod* 2004;30:315-20.
6. Kayaoglu G, Ørstavik D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004;15:308-20.
7. Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, et al. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J Endod* 2006;32:93-98.
8. Haapasalo H, Sirén E, Waltimo T, et al. Inactivation of local root canal medicaments by dentine: an in vitro study. *Int Endod J* 2000;33: 126-31.
9. Kendall MJ. Esomeprazole - the first proton pump inhibitor to be developed as an isomer. *Alim Pharmacol Ther* 2003;17(Suppl. 1):1–4.
10. Olbe L, Carlsson E, Lindberg P. Proton-pump inhibitor expedition: the case histories of Omeprazole and Esomeprazole. *Nature Rev Drug Discov* 2003;2:132-39.
11. Loo VG, Fallone CA, De Souza E, et al. In vitro susceptibility of *Helicobacter pylori* to ampicillin, clarithromycin, metronidazole and omeprazole. *J Antimicrob Chemother* 1997;40:881–83.

12. Scott D, Weeks D, Melchers K, et al. The life and death of *Helicobacter pylori*. Gut 1998;43(Suppl. 1):S56–60.
13. Andersen LP, Colding H, Kristiansen JE. Potentiation of the action of metronidazole on *Helicobacter pylori* by omeprazole and bismuth subcitrate. Int J Antimic Ag 2000;14:231-34.
14. Kedika RR, Souza RF, Spechler SJ. Potential anti-inflammatory effects of proton pump inhibitors: a review and discussion of the clinical implications. Dig Dis Sci 2009;54:2312–17.
15. Tuukkanen J, Väänänen HK. Omeprazole, a specific inhibitor of H⁺–K⁺-ATPase, inhibits bone resorption *in vitro*. Calcif tissue Int 1986;38:123-25.
16. Hyunn JJ et al. Effect of omeprazole on the expression of transcription factors in osteoclasts and osteoblasts. Int J Mol Med 2010;26:877-83.
17. Stashenko P, Tani-Ishii N, Yu SM. Pathogenesis of induced rat periapical lesions. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1994;78:494-502.
18. Xiong H, Wei L, Peng B. Immunohistochemical localization of IL-17 in induced rat periapical lesions. J Endod 2009;35:216-20.
19. Metzger Z, Klein H, Klein A, et al. Periapical lesion development in rats inhibited by dexamethasone. J Endod 2002;28:643-45.
20. Rockenbach MI, Veeck EB, Costa NP. Detection of proximal caries in conventional and digital radiographs: an *in vitro* study. Stomatologija 2008;10:115-20.
21. Zhang R, Wang L, Peng B. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase in rat periapical lesions. J Endod 2008;34:1207-1210.
22. Wang L, Peng B. Correlation between platelet-derived growth factor B chain and bone resorption in rat periapical lesions. J Endod 2007;33:709-11.

23. Leonardo MR, Silva LAB, Leonardo RT, Utrilla LS, Assed S. Histological evaluation of therapy using a calcium hydroxide dressing for teeth with incompletely formed apices and periapical lesions. *J Endod* 1993;19:348-52.
24. Estrela C, Pimenta FC, Ito IY, Bammann LL. Antimicrobial evaluation of calcium hydroxide in infected dentinal tubules. *J Endod* 1999;26:416-18.
25. Sathorn C, Parashos P, Messer H. Antibacterial efficacy of calcium hydroxide intracanal dressing: a systematic review and meta-analysis. *Int Endod J* 2007;40:2-10.
26. Tang G, Samaranayake LP, Yip H-K. Molecular evaluation of residual endodontic microorganisms after instrumentation, irrigation and medication with either calcium hydroxide or Septomixine. *Oral Diseases* 2004;10:389-97.
27. Love RM. Regional variation in root dentinal tubule infection by *Streptococcus gordonii*. *J Endod* 1996;22:290-293.
28. Love RM, Jenkinson HF. Invasion of dentinal tubules by oral bacteria. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002;13:171-83.
29. Lin SK, Kok SH, Lee YL, Hou KL, Lin YT, Chen MH, et al. Simvastatin as a novel strategy to alleviate periapical lesions. *J Endod* 2009;35:657-662.
30. Wang L, Zhang R, Peng B. Expression of a novel PDGF isoform, PDGF-C, in experimental periapical lesions. *J Endod* 2009;35:377-381.
31. Tronstad L, Andreasen JO, Hasselgren G, et al. pH changes in dental tissues after root canal filling with calcium hydroxide. *J Endod* 1981;7:17-22.
32. Robert GH, Liewehr FR, Buxton TB, et al. Apical diffusion of calcium hydroxide in an *in vitro* model. *J Endod* 2005;31:257-82.

33. Gomes BPF, Ferraz CCR, Vianna ME, et al. *In vitro* antimicrobial activity of calcium hydroxide pastes and their vehicles against selected micro-organisms. *Braz Dent J* 2002;13:155-61.
34. Peters LB, van Winkelhoff AJ, Buijs JF et al. Effects of instrumentation, irrigation and dressing with calcium hydroxide on infection in pulpless teeth with periapical bone lesions. *Int Endod J* 2002;35:13-21.
35. 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;36:1467-1474.

Legends to the Figures

Figure 1 – Comparison of the effects of Ca(OH)_2 and Ca(OH)_2 associated with omeprazole on the size of periapical lesions in rats: radiographic analysis. (A and B) The columns represent the mean of 6 experiments and the vertical lines indicate the standard error mean. * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$. (C, D and E) Representative images of periapical lesions in negative control, Ca(OH)_2 and Ca(OH)_2 plus omeprazole experimental groups, respectively.

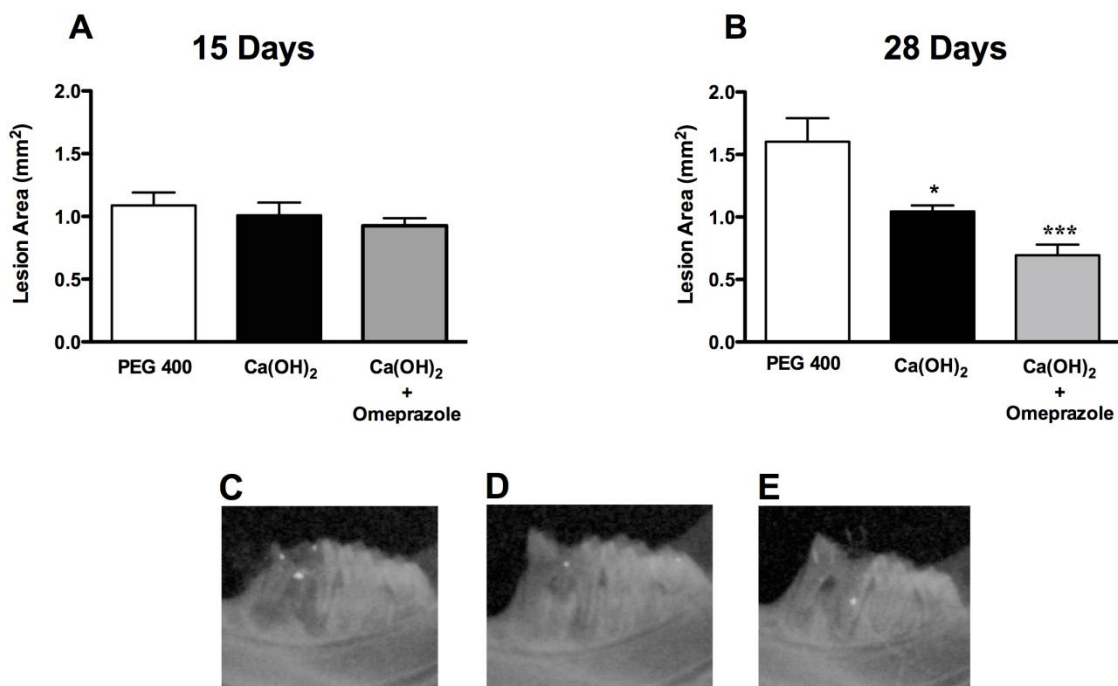


Figure 2 – Comparison of the effects of $\text{Ca}(\text{OH})_2$ and $\text{Ca}(\text{OH})_2$ associated with omeprazole in the rat model of periapical lesions: microbiological analysis. (A, B) The columns represent the mean of 6 experiments and the vertical lines indicate the standard error mean. (C, D) The columns represent the frequency (in percentage) of each analyzed parameter.

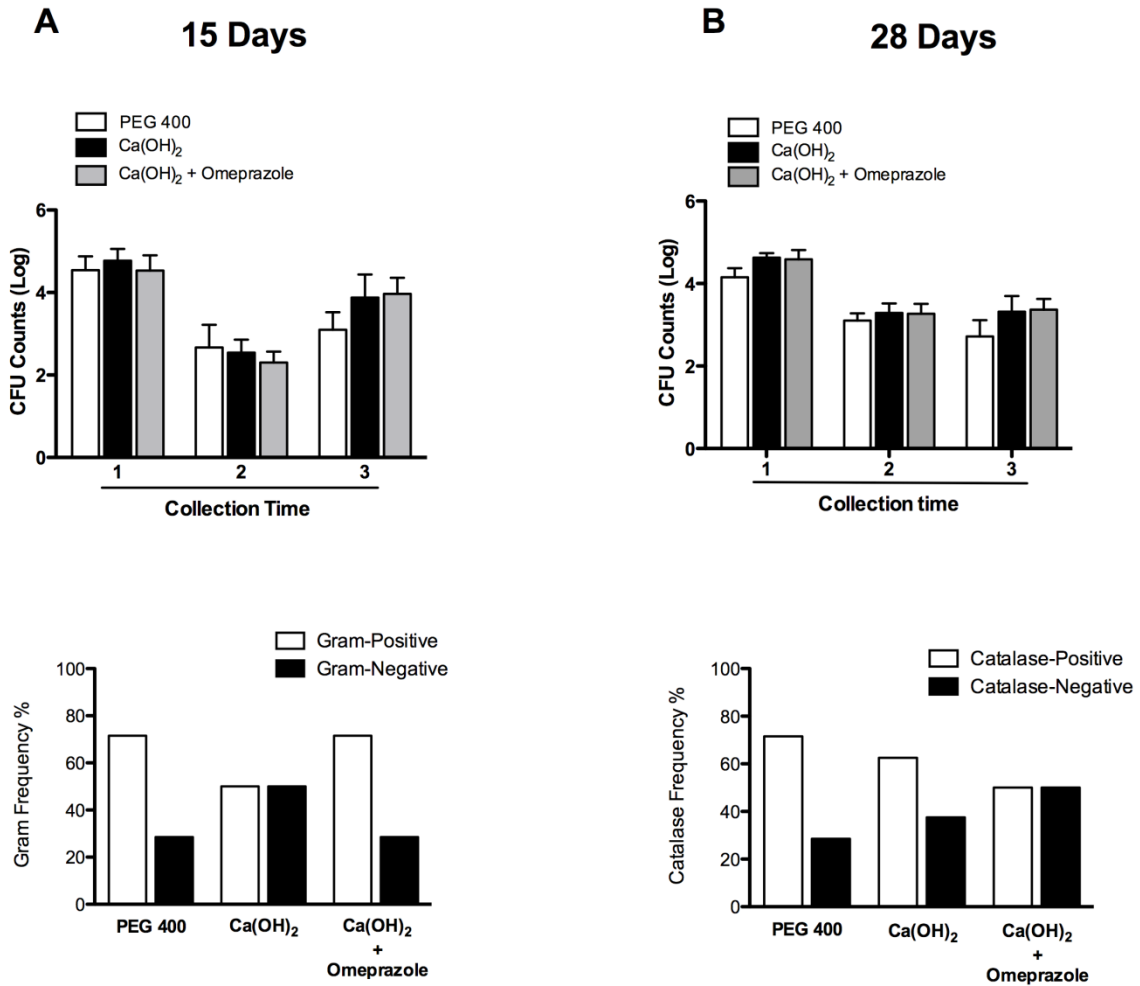
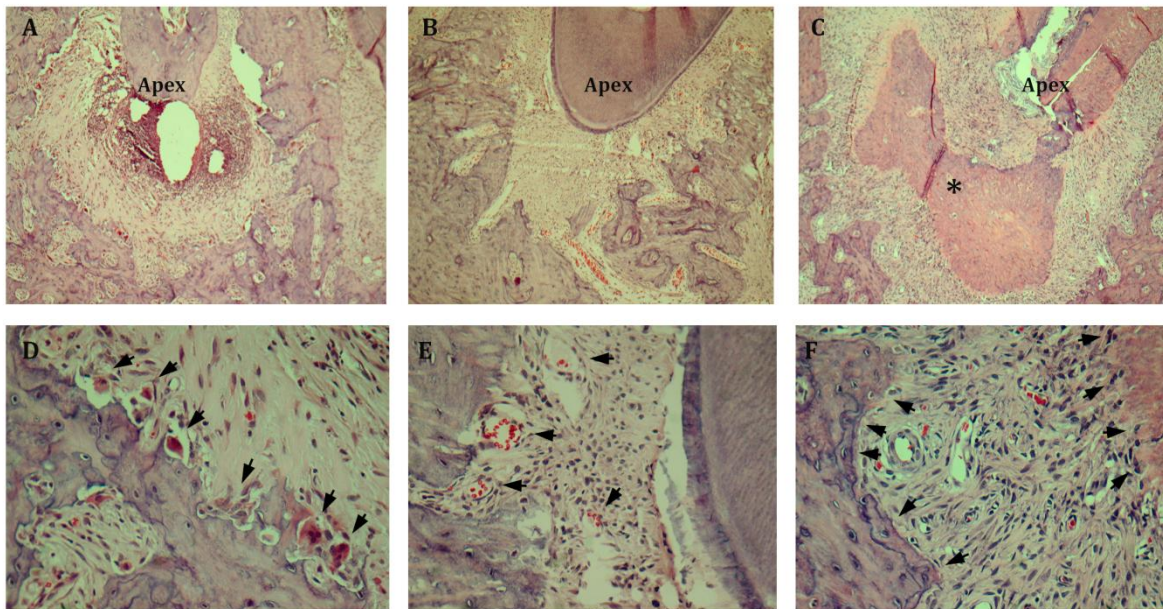


Figure 3 – Comparison of the effects of $\text{Ca}(\text{OH})_2$ and $\text{Ca}(\text{OH})_2$ associated with omeprazole in the rat model of periapical lesions: histological analysis. (A) Histopathological examination showed periapical bone resorption associated with pronounced inflammation in the negative control group (100X). (D) A high-power view of panel A showing osteolytic lacunae (arrows, 400X). (B, C) Reduced inflammatory cell infiltration in $\text{Ca}(\text{OH})_2$ and $\text{Ca}(\text{OH})_2$ plus omeprazole groups, respectively. *Extensive reparative bone formation (100X). (E) A high-power view of panel B showing neovascularization areas (arrows, 400X). (F) A high-power view of panel C showing bone formation areas (arrows, 400 X).



Considerações finais

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diversos autores consideram o hidróxido de cálcio como um importante aliado não só na eliminação de bactérias que não são efetivamente removidas durante o preparo químico-mecânico, mas também na prevenção da recontaminação, por estas bactérias, dos espaços pulpares. Entretanto, esta medicação apresenta certas limitações como a interação com a dentina que, ao exercer ação de tamponamento, limita a ação do Ca(OH)_2 . Além disso, certas bactérias, como o *E. Faecalis*, são capazes de sobreviver às diversas fases do tratamento endodôntico, inclusive ao curativo de demora à base de Ca(OH)_2 , especialmente devido à uma bomba de prótons funcional existente na sua membrana, que regula a homeostase do citoplasma. Levando estes dados em consideração, o presente estudo avaliou o efeito da associação de omeprazol, medicação inibidora de bomba de prótons amplamente utilizada no tratamento de úlcera péptica infecciosa, ao Ca(OH)_2 , em lesões periapicais induzidas em ratos.

Radiograficamente, foi demonstrado que em 15 dias de medicação intracanal, ambas medicações de Ca(OH)_2 e, de Ca(OH)_2 associado ao omeprazol, não afetaram significativamente o tamanho das lesões periapicais. Entretanto, em 28 dias de medicação intracanal, as duas medicações diminuíram significativamente o tamanho das lesões periapicais, quando comparadas ao grupo controle, sendo que essa redução foi significativamente melhorada pela associação de omeprazol ao Ca(OH)_2 . Estes dados foram fundamentais para confirmar que o modelo experimental escolhido se mostrou satisfatório para as análises planejadas.

De acordo com a análise histológica, no grupo controle, foi observada reabsorção óssea associada a proeminente infiltrado de células inflamatórias, enquanto que nos grupos Ca(OH)_2 e Ca(OH)_2 mais omeprazol, foi observado um infiltrado inflamatório mínimo, com presença de áreas de neovascularização e de neoformação óssea, especialmente no grupo

onde o omeprazol foi associado. Estes dados confirmam e estendem aqueles obtidos por meio da análise radiográfica.

A primeira coleta microbiológica (S1) teve uma contagem de UFC maior, quando comparada com os tempos S2 e S3, em todos os grupos experimentais. No entanto, tanto em 15 como em 28 dias de medicação intracanal, não houve diferenças significativas nas contagens de UFC entre S2 e S3, e nem entre os diferentes grupos experimentais durante S3. Apesar de não ter sido observada diferença entre as medicações quanto a contagem de UFC, pode-se observar que Ca(OH)_2 combinado ao omeprazol interferiu na porcentagem de bactérias catalase negativas, quando comparado aos grupos controle e Ca(OH)_2 e, quanto à coloração de Gram, foi possível observar um efeito inibitório sobre cocos Gram-positivos no grupo Ca(OH)_2 , em relação aos grupos controle ou a Ca(OH)_2 mais omeprazol. Estes dados permitem sugerir que a associação de omeprazol ao Ca(OH)_2 é capaz de induzir mudanças no perfil bacteriano intracanal, o que pode estar relacionado com os resultados benéficos observados com essa associação medicamentosa, tanto na avaliação radiográfica, quanto histológica, em comparação com a aplicação isolada de Ca(OH)_2 .

Apesar dos resultados promissores para a associação de omeprazol ao Ca(OH)_2 observados em nosso trabalho, fica claro que mais estudos são necessários para determinar concentrações mais eficazes, além de realizar uma melhor caracterização bacteriana, a fim de avaliar como esta associação afeta a microbiota. Ademais, considerando os dados prévios da literatura, seriam necessários estudos adicionais para avaliar o real efeito modulatório do omeprazol sobre bombas de efluxo de bactérias envolvidas nas infecções endodônticas. Finalmente, como discutido no presente trabalho, alguns estudos recentes têm demonstrado que o omeprazol, além de outros membros da mesma classe farmacológica, são capazes de modular a resposta inflamatória, bem como o *turnover* ósseo, de acordo com a avaliação *in vitro*. Assim, é imperativo que outros estudos avaliem como a associação de omeprazol com

Ca(OH)₂ poderia apresentar efeito anti-inflamatórios, quando testada no modelo *in vivo* de lesões periapicais em ratos; isso poderia ser alcançado através de técnicas bioquímicas ou de biologia molecular. Como última consideração, cabe destacar a importância de investigar os efeitos do omeprazol sobre proteínas implicadas no reparo ósseo, tais como RANKL e OPG.

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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 20:340-49.
2. Sundqvist G. Bacteriological studies of necrotic dental pulps [Dissertation]. Umea (Sweden): University of Umea; 1976.
3. Sundqvist G. Ecology of the root canal flora. *J Endod.* 1992 Sep 18(9): 427-30.
4. Sundqvist G. Taxonomy, ecology, and pathogenicity of the root canal flora. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1994 Oct 78(4):522-30.
5. Nair PNR. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failure. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2004 Nov 15(6):348-81.
6. Love RM, Jenkinson HF. Invasion of dentinal tubules by oral bacteria. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2002 Mar 13(2):171-83.
7. Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *Int Endod J.* 2002 Mar 35(3):221–228.
8. Siqueira Jr JF. Microbial causes of endodontic flare-ups. *Int Endod J.* 2003 Jul 36(7):453-63.
9. Nair PNR. On the causes of persistent apical periodontitis: a review. *Int Endod J.* 2006 Apr 39(4):249-81.
10. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1998 Jan 85(1):86-93.

11. Siqueira Jr JF, Sen BH. Fungi in endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004 May 97(5):632-41.
12. Siqueira Jr JF, Roças IN. Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. *J Endod.* 2008 Nov 34(11):1291-1301.e3
13. Roças IN, Siqueira Jr JF, Santos KRN. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod.* 2004 May 30(5):315-20.
14. Kayaoglu G, Ørstavik D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2004 Sep 15(5):308-20.
15. Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owartz CB. *Enterococcus faecalis*: Its Role in Root Canal Treatment Failure and Current Concepts in Retreatment. *J Endod.* 2006 Feb 32(2):93-98.
16. Figdor D, Davies JK, Sundqvist G. Starvation survival, growth and recovery of *Enterococcus faecalis* in human serum. *Oral Microbiol & Immunol.* 2003 Aug 18(4):234-239.
17. Welch W. How cells respond to stress. *Sci Amer.* 1993 May 268(5):56-64.
18. Padan E, Bibi E, Ito M, Krulwich TA. Alkaline pH homeostasis in bacteria: New insights. *BBA.* 2005 Nov 1717(2): 67-8.
19. Benito B, Garciadeblás B, Pérez-Martín J, Rodríguez-Navarro A. Growth at High pH and Sodium and Potassium Tolerance in Media above the Cytoplasmic Ph Depend on ENA ATPases in *Ustilago maydis*. *Eukar Cell.* 2009 June 8(6):821-29.
20. Slonczewski JL, Fujisawa M, Dopson M, Krulwich TA. Cytoplasmic pH measurements and homeostasis in bacteria and archaea. In: Robert K. Poole, editor. *Advances in microbial physiology.* Maryland Heights, USA: Elsevier; 2009. v. 55

21. Li XZ, Kikaido H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria. *Drugs*. 2004 Sep 64(2):159–204.
22. Falsafi T, Ehsani A, Niknam V. The role of active efflux in antibiotic - resistance of clinical isolates of *Helicobacter pylori*. *Indian J Med Microbiol*. 2009 Oct-Dec 27(4):335-40.
23. Lomovskaya A, Lee K, Hoshino H, Ishida A, Mistry MS, Warren E et al. Use of a genetic approach to evaluate the consequences of inhibition of efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999 Jun 43(6):1340–46.
24. Safavi K, Spångberg L, Langeland K. Root canal dentinal tubule disinfection. *J Endod*. 1990 May 16(5):207-10.
25. Haapasalo H, Sirén E, Waltimo T, Ørstavik D, Haapasalo M. Inactivation of local root canal medicaments by dentine: an in vitro study. *Int Endod J*. 2000 Mar 33(2): 126-31.
26. Peters L, Wesselink P, Moorer W. Penetration of bacteria in bovine root dentine in vitro. *Int Endod J*. 2000 Jan 33(1):28-36.
27. Kendall MJ. Esomeprazole - the first proton pump inhibitor to be developed as an isomer. *Alim Pharmacol Ther*. 2003 Mar 17(Suppl. 1):1–4.
28. Hoogerwerf WA, Pasricha PJ. Farmacoterapia da acidez gástrica, úlceras pépticas e doenças do refluxo gastroesofágico. In: Brunton LL, Lazo JS, Parker KL. Goodman e Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil; 2006. p. 869-81.
29. Israel DM, Hassall E. Omeprazole and Other Proton Pump Inhibitors: Pharmacology, Efficacy, and Safety, with Special Reference to Use in Children. *J Pediatric Gastroenterol & Nutr*. 1998 Nov 27(5):568-79.
30. Horn JR, Howden CW. Similarities and differences among delayed-release proton-pump inhibitor formulations. *Aliment Pharmacol Ther*. 2005 Nov 22(Suppl. 3):20–24.

31. Hunt RH. The unmet needs in delayed-release proton-pump inhibitor therapy in 2005. *Aliment Pharmacol Ther.* 2005 Nov 22(Suppl. 3):10–19.
32. Olbe L, Carlsson E, Lindberg P. Proton-pump inhibitor expedition: the case histories of Omeprazole and Esomeprazole. *Nature Rev Drug Discov.* 2003 Feb 2(2):132-39.
33. Hellström PM, Vitols S. The Choice of Proton Pump Inhibitor: Does it matter? *Basic & Clin Pharmacol & Toxicol.* 2004 Mar 94(3):106–11.
34. Loo VG, Fallone CA, De Souza E, Lavallée J, Barkun AN. In vitro susceptibility of *Helicobacter pylori* to ampicillin, clarithromycin, metronidazole and omeprazole. *J Antimicrob Chemother.* 1997 Dec 40(6):881–83.
35. Scott D, Weeks D, Melchers K, Sachs G. The life and death of *Helicobacter pylori*. *Gut.* 1998 Jul 43(Suppl. 1):S56–60.
36. Andersen LP, Colding H, Kristiansen JE. Potentiation of the action of metronidazole on *Helicobacter pylori* by omeprazole and bismuth subcitrate. *Int J Antimic Ag.* 2000 Apr 14(3): 231-34.
37. Hashioka S, Klegeris A, McGeer PL. Proton pump inhibitors exert anti-inflammatory effects and decrease human microglial and monocytic THP-1 cell neurotoxicity. *Experim Neurol.* 2009 May 217(1):177-83.
38. Tanigawa T, Watanabe T, Higuchi K, Machida H, Okazaki H, Yamagami H et al. Lansoprazole, a proton pump inhibitor, suppresses production of tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β induced by lipopolysaccharide and *Helicobacter pylori* bacterial components in human monocytic cells via inhibition of activation of nuclear factor- κ B and extracellular signal-regulated kinase. *J Clin Biochem Nutr.* 2009 Jul 45 (1):86–92.
39. Kedika RR, Souza RF, Spechler SJ. Potential anti-inflammatory effects of proton pump inhibitors: a review and discussion of the clinical implications. *Dig Dis Sci.* 2009 Aug 54(11):2312–17.

40. Tuukkanen J, Väänänen HK. Omeprazole, a specific inhibitor of H⁺-K⁺-ATPase, inhibits bone resorption *in vitro*. *Calcif tissue Int.* 1986 Mar 38(2):123-25.

41. Hyunn JJ et al. Effect of omeprazole on the expression of transcription factors in osteoclasts and osteoblasts. *Int J Mol Med.* 2010 Dec 26(6):877-83.

Anexos

ANEXOS

ANEXO A – Carta de aprovação pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia – PUCRS



COMISSÃO CIENTÍFICA E DE ÉTICA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA PUCRS

Porto Alegre, 06 de abril de 2010.

Prezado(a) Pesquisador(a):

O projeto de: Dissertação

Protocolado sob nº: 021/10

Intitulado: Eficácia da associação de inibidores da bomba de prótons com pasta de hidróxido de cálcio como medicação intracanal em dentes de ratos com lesões periapicais

Pesquisador Responsável: Profa. Dra. Maria Martha Campos

Pesquisadores Associados: Cláudia Wagner

Nível: Mestrado

Parecer da Comissão:

Projeto aprovado.

Profa. Dra. Ana Maria Spohr

Presidente da Comissão Científica e de Ética da FO-PUCRS

ANEXO B – Carta de aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais –PUCRS



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA PARA O USO DE ANIMAIS

Ofício 116/10 – CEUA

Porto Alegre, 10 de junho de 2010.

Senhora Pesquisadora:

O Comitê de Ética para o Uso de Animais apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa, registro CEUA 10/00164, intitulado: **“Eficácia da associação de inibidores da bomba de prótons com pasta de hidróxido de cálcio como medicação intracanal em dentes de ratos com lesões periapicais”**.

Sua investigação está autorizada a partir da presente data.

Atenciosamente,


Profa. Dra. Anamaria Gonçalves Feijó
Coordenadora do CEUA – PUCRS

Ilma. Sra.
Profa. Dra. Maria Martha Campos
Faculdade de Odontologia
N/Universidade

PUCRS

Campus Central

Av. Ipiranga, 6690 – Prédio 60, sala 314
CEP: 90610-000
Fone/Fax: (51) 3320-3345
E-mail: ceua@pucrs.br

ANEXO C – Submissão do artigo de pesquisa ao periódico Journal of Endodontics

From: The Journal of Endodontics <JEndodontics@uthscsa.edu>
To: camposmmartha@yahoo.com
Sent: Tue, March 1, 2011 1:02:40 PM
Subject: Submission Confirmation for In vivo study on the effectiveness of the proton pump inhibitor omeprazole associated to calcium hydroxide as intracanal medication

Dear Dr. Campos,

Your submission entitled "In vivo study on the effectiveness of the proton pump inhibitor omeprazole associated to calcium hydroxide as intracanal medication" 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: maria.campos

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