UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

JÉSSICA DE ALMEIDA COELHO

**Extrusão microbiana e contaminação intradentinária após
a utilização da PUI e da CUI em diferentes momentos**

BAURU
2020

JÉSSICA DE ALMEIDA COELHO

**Microbial extrusion and intradentary contamination after the use
of PUI and CUI in different moments**

**Extrusão microbiana e contaminação intradentinária após
a utilização da PUI e da CUI em diferentes momentos**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Endodontia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Flaviana Bombarda de Andrade

“Versão Corrigida”

BAURU

2020

Coelho, Jéssica de Almeida

Extrusão microbiana e contaminação
intradentinária após a utilização da PUI e da CUI em
diferentes momentos / Jéssica de Almeida Coelho. –
Bauru, 2020

90p. : il. ; cm.

Dissertação de Mestrado – Faculdade de
Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Flaviana Bombarda de
Andrade

Nota: A versão original desta dissertação encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP.]

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

Projeto de pesquisa aprovado pelo
Comitê de Ética em Pesquisa da
Faculdade de Odontologia de Bauru,
Universidade de São Paulo, em 04 de
Dezembro de 2018.

Comitê de Ética da FOB-USP
Registro **CAAE:**
02779018.8.0000.5417

FOLHA DE APROVAÇÃO

DEDICATÓRIA

A Deus que nos criou e foi criativo nesta tarefa. Seu fôlego de vida em mim me foi sustento e me deu coragem para questionar realidades e propor sempre um novo mundo de possibilidades.

Aos meus pais pelo apoio, o amor e a paciência. Por acreditarem e investirem em mim.

A minha irmã pela força, coragem e conselhos que me transmitiu durante toda essa trajetória.

Muito obrigada, amo todos vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos

À **Deus** por me sustentar e dar forças nos momentos difíceis e de provações que passei nesse período, dando-me a cada dia oportunidades de aprendizado e evolução pessoal e profissional. Obrigada por me permitir realizar mais esse sonho.

Aos meus amados **pais**, Sandra e Alípio, cuja presença constante me passou a certeza e a segurança de que não estava sozinha nessa caminhada. Em meio às dificuldades, sempre me mostraram que a dor é passageira e que a colheita seria generosa. Sempre plantar para só então colher. Obrigada por serem exemplos de perseverança, generosidade e amor.

A minha amada **irmã** Carolina, por tanta preocupação e cuidado ao longo dessa trajetória, não medindo esforços para me ajudar e acolher meus medos e conflitos. Você sempre foi minha grande inspiração pessoal e profissional. Obrigada por me amar incondicionalmente e por ser meu porto seguro.

Ao meu **namorado** Alúcio, pelos cuidados, paciência e motivação nos momentos de desânimo que passei durante essa caminhada. Obrigada por ser meu confidente e melhor amigo.

Ao meu **cunhado** Gabriel, agradeço por diversos momentos de conversas e reflexões, por me fazer enxergar de diferentes formas um mesmo contexto.

Agradecimento aos professores

'Extintos não foram todos, restam poucos, ainda heroicos, ainda desbravadores.'

A minha querida orientadora **Profª Drª Flaviana Bombarda de Andrade**. Obrigada por todos os ensinamentos e oportunidades. Obrigada por todo o conhecimento compartilhado, por todas as conversas e acolhimento de minhas dúvidas e por confiar em mim para realização desse e de outros tantos trabalhos. A senhora me ensinou muito. Meu sincero agradecimento por tudo, por cada dia!

Ao **Profª Drª Marco Antonio Hungaro Duarte** por todos os ensinamentos, por cada conhecimento compartilhado da melhor maneira possível. Por toda a ajuda e compreensão, pela sua humildade que me inspira e por dedicar sua vida ao mundo da docência. Foi uma enorme honra ter conhecido o senhor e poder trabalhar perto de uma de minhas referências acadêmicas.

Ao **Profª Drª Rodrigo Ricci Vivan** por todos os ensinamentos compartilhados, por toda a ajuda e contribuição para a elaboração deste trabalho. Obrigada por mostrar que ser professor não é só dar aulas, mas incentivar a busca pelas respostas.

Ao **Profª Drª Murilo Alcalde** pela ajuda na elaboração deste trabalho e por me guiar nos momentos de dúvidas.

Ao **Profª Drª Roberto Brandão Garcia** por todos os ensinamentos compartilhados, pelo carinho com os alunos e pelo cuidado em nos fazer mergulhar a fundo em suas explicações. Foi uma honra ter o senhor arguindo meus seminários.

Aos Professores do departamento de Endodontia da FOB-USP; **Clóvis Monteiro Bramante, Norberti Bernardineli**, por todos os ensinamentos, mas principalmente o amor pela docência.

Ao **Profº Drº Evandro Watanabe** que foi meu co-orientador na graduação durante minha iniciação científica na FORP-USP. O senhor é um ser humano incrível, com toda a sua paciência, sabedoria e humildade, nunca mediu esforços para me ajudar. Admiro seu trabalho e sou grata por todos os ensinamentos desde a época de graduação. Muito obrigada por também aceitar formar a minha banca avaliadora e contribuir ainda mais com esse momento tão especial.

Ao **Profº Drº Christian Giampietro Brandão** obrigada por ter aceitado prontamente nosso convite, deixando seus afazeres na Universidade estadual do Paraná. É uma honra tê-lo em minha banca.

Meu muito obrigada aos funcionários do Departamento de Endodontia, **Suely Regina Bettio** e **Edimauro de Andrade**, por sempre estarem a disposição para nos ajudar, pelas brincadeiras para descontrair nosso dia, muito obrigada!

Aos meus amigos da pós-graduação

À **Maricel Rosario Cardenas Cuéllar**, que foi meu braço direito e parte fundamental para o andamento da pesquisa. Sinônimo de perseverança e de resiliência, sempre disposta a ajudar quem quer que seja. A sua amizade me mostrou que temos diversas formas de encarar os problemas e que é fundamental sorrir e sermos gratos pelo aqui e pelo agora. Sempre ficarei na dúvida se nossa personalidade capricorniana nos uniu ou se foi nossa forma de encarar a vida com fé. Palavras seriam insuficientes para expressar minha gratidão por tanto nesses dois anos de convivência. Uma mulher linda e extremamente dedicada que é um exemplo de profissional, amiga e filha. Desejo que você conquiste todos os seus sonhos, minha companheira de pós-graduação, amo muito você, estarei aqui para você sempre,

À **Daniela Cusicanqui**, pessoa de uma fé inesgotável e com o sorriso solto. Pronta para qualquer aventura e disposta a encarar o que for preciso para te ajudar. Sou grata a Deus por você ter cruzado o meu caminho e por tantas histórias inesquecíveis que vivemos juntas. Que você nunca perca sua alegria de viver e seu amor pela vida acadêmica. Sou sua fã amiga!

À **Evellyn Velasquez**, pela amizade que vem desde a época de especialização no centrinho e trago com grande carinho para a vida. Obrigada por tantos momentos que passamos na presença uma da outra.

À **Letícia Cintelli** e **Vanessa Marques**, pelas conversas sinceras, apoio e parceria durante esses dois anos. Vocês me inspiram na pesquisa e na vida. Obrigada por me ensinarem que as pequenas conquistas diárias também devem ser exaltadas e que com dedicação e esforço nossos sonhos são gradativamente transformados em realidade. Que a luz de vocês nunca se apague.

À **Gláucia Gonçalves**, por ter sido uma das primeiras amizades na pós-graduação. Obrigada pela compreensão, conversas e risadas compartilhadas. Desejo que seu caminho seja repleto de trabalho e sorrisos.

Ao **Victor Feliz**, menino de alegria contagiante e sorriso fácil. Obrigada por toda a ajuda e pelos muitos momentos de descontração que me mostraram um jeito leve de encarar as surpresas da vida. Agradeço por sua amizade.

À **Gabriela Nascimento**, mulher de jeito calmo e acolhedor, nos presenteou com sua amizade e com um endobaby. Muita luz no seu caminho amiga.

À **Gabriela Piai**, que se tornou uma grande amiga, com seu jeito sensato de lidar com os problemas, sempre me mostrou uma maneira mais leve de encarar o dia a dia da pós-graduação. Sua amizade é um presente.

À minha turma de mestrado, **Pedro Calefi, Roberto, Evelyn e Gabriela**, onde cada um com sua personalidade particular fez de nós uma equipe. Sou muito grata por ter vocês quatro em minha turma, pois aprendi muito com cada um de vocês. Espero que a nossa amizade seja levada para toda a vida.

A todos os meus amigos da pós-graduação da endodontia e outras áreas, **Pedro Titato, Mariana Borges, Clarissa Teles, Samila Monterio, Arthur Lemos, Renan Furlan, German, Gislene Vertuan, Shirley, Paulo Jara, Lorena Garrido, Larissa Borges, Thalita Tartari, Dayanne Simões**, obrigada pela amizade de cada um de vocês!

Aos amigos que tive a honra de colaborar com seus trabalhos e que certamente aprendi mais do que ensinei, **Mirela Barros; Thalyta Dourado; Israel Terminello; Miguel da Cunha; Thamires Campos**. Obrigada pela parceria, confiança e amizade!

As minhas amigas da faculdade: **Marina Paulini, Giselle da Silva, Júlia Custódio, Daniela Madlum, Caroline Alves e Ariel Mançanares**, pelo incentivo e apoio sobre a realização do mestrado. Mesmo estando cada uma em um lugar, continuamos juntas, apoiando umas as outras. Muito obrigada pela amizade, vocês são parte de mim, amo vocês!

Obrigada a **CAPES**, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil, pela concessão da bolsa de estudos para realização dessa pesquisa. Código de Financiamento 001.

Sou muito grata a DEUS, por ter colocado cada um de vocês na minha vida, vocês são muito especiais, cada um tem um lugar especial no meu coração!

RESUMO

O sucesso do tratamento endodôntico depende da descontaminação do sistema de canais radiculares. Em busca da limpeza efetiva de um sistema tridimensionalmente complexo, a agitação ultrassônica da substância irrigadora se faz necessária. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito antibacteriano e a extrusão periapical frente a diferentes protocolos de irrigação ultrassônica passiva (PUI) e contínua (CUI) em variados tempos, volumes e momentos, apenas no terço cervical, apenas no terço apical ou nos dois terços. Incisivos inferiores humanos foram selecionados, contaminados com *Enterococcus faecalis* e divididos em grupos. Os grupos passaram por diferentes protocolos da PUI e CUI onde a agitação ultrassônica foi realizada em terços distintos do conduto radicular em cada um dos artigos gerados. Realizou-se o escaneamento em micro-CT para avaliar detritos extruídos e coleta microbiológica dos debris para determinação da carga (UFC/mL) e a viabilidade bacteriana nos túbulos dentinários por meio de microscopia confocal de varredura a laser (MCVL). Para a análise estatística, foi utilizado o teste Kruskal-Wallis, conforme a ausência de normalidade dos dados, com um nível de significância de 5%. Em ambos os artigos pode-se concluir que houve uma tendência na redução bacteriana intratubular quando a irrigação ultrassônica, passiva ou contínua, foi realizada em dois momentos, com os protocolos de uso propostos. A extrusão bacteriana para a região periapical ocorreu em menor grau nos grupos utilizando-se a irrigação ultrassônica passiva.

Palavras chave: *Enterococcus faecalis*; Ultrassom; Bactéria; Irrigação terapêutica

ABSTRACT

Microbial extrusion and intradentary contamination after the use of PUI and CUI in different moments

The success of endodontic treatment depends on the decontamination of the root canal system. In order to effectively clean a three-dimensionally complex system, ultrasonic agitation of the irrigant substance is necessary. The aim of this study was to evaluate the antibacterial effect and periapical extrusion against different passive (PUI) and continuous (CUI) irrigation protocols of the irrigant at different times, volumes and moments, only at the cervical third, only at the apical third or in both thirds. Human lower incisors were selected, contaminated with *Enterococcus faecalis* and divided into groups. The groups went through different PUI and CUI protocols where the ultrasonic agitation was performed in different thirds of the root canal in each of the articles generated. Micro-CT scanning was performed to assess extruded debris, microbiological sample of the extruded content for counting the number of CFU/mL and the bacterial viability in the dentinal tubules by means of laser scanning confocal microscopy (CLSM). For statistical analysis, the Kruskal-Wallis test was used, according to the absence of the data normality, with a significance level of 5%. In both articles, it can be concluded that there was a trend in the intratubular bacterial reduction when ultrasonic irrigation, passive or continuous, was performed in two moments, with the proposed protocols used. Periapical bacterial extrusion lesser degree occurred in the groups using passive ultrasonic irrigation. **Keywords:** *Enterococcus faecalis*; Ultrasound; Bacteria; Therapeutic Irrigation

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	ARTIGO.....	19
2.1	Artigo 1 - Eficácia antimicrobiana de seis protocolos suplementares de irrigação ultrassônica contínua e passiva: estudo <i>in vitro</i>	19
2.1	Artigo 2 - Influência na redução bacteriana e extrusão periapical de detritos com diferentes protocolos de uso da irrigação ultrassônica passiva	41
3	DISCUSSÃO.....	65
4	CONCLUSÃO.....	73
	REFERÊNCIAS	77
	ANEXO	85

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Bactérias são os principais agentes etiológicos das doenças da polpa e do periápice, pois, sua presença leva ao quadro de necrose pulpar e desenvolvimento da periodontite apical^{27,28}. O sistema de canais radiculares (SCR) apresenta complexidades anatômicas, como ramificações apicais, regiões de istmos e achatamentos, que desafiam a completa desinfecção durante a terapia endodôntica de polpas necróticas¹⁰. O objetivo preliminar de todos os procedimentos endodônticos, especialmente limpeza e modelagem, é eliminar o tecido necrótico, microrganismos e seus produtos^{9,14}. Para atingir a consecução deste objetivo, emprega-se o preparo químico-mecânico do SCR^{11,25} que deve propiciar condições viáveis para o reparo dos tecidos periapicais^{13,14}.

Embora os instrumentos mecanizados¹⁸ apresentem inúmeros pontos que evidenciem a limpeza do SCR, a variedade anatômica destes canais leva ao desbridamento incompleto, mantendo diversas áreas de dentina não tocadas^{1,40}. Além disso, a ação de corte dos instrumentos em contato com as paredes do canal cria uma camada de esfregaço, acúmulo de detritos de tecidos orgânicos e inorgânicos, que se alojam nas irregularidades das paredes e túbulos dentinários^{47,48}. Assim, os instrumentos endodônticos isoladamente são incapazes de promover o desbridamento satisfatório do SCR, fazendo-se necessário o uso de soluções químicas auxiliares^{47,48}.

Em áreas de complexidades anatômicas, a limpeza e assepsia são proporcionadas unicamente pela ação de soluções químicas. Além da natureza química da solução utilizada, o método de irrigação pode influenciar na descontaminação e desbridamento na terapia endodôntica. O mecanismo mais empregado para a distribuição da solução ainda é a irrigação convencional, realizada por meio de cânulas e seringas de pequenos calibres²⁰.

A irrigação convencional possui um sistema de entrega do irrigante onde a profundidade de colocação da ponta da cânula no canal radicular é o principal fator para a penetração da solução^{16,21,33}. A agitação manual da solução faz com que a técnica apresente limitações quanto à distribuição adequada do irrigante ao SCR,

comprometendo a qualidade da descontaminação¹⁶. A extensão da ação de descarga obtida (sistema de entrega) é muito modesta quando a irrigação é realizada com agulha com abertura lateral. Essa agitação desaloja apenas detritos e microrganismos que se encontram fracamente aderidos às paredes do canal radicular, sendo insuficiente para atingir grandes profundidades no interior dos túbulos dentinários^{48,49}.

A eficácia da descontaminação tridimensional do SCR em muito depende da ação da descarga mecânica (sistema de entrega) do irrigante, que deve ser eficiente^{9,25,38,48}. Novos métodos e sistemas de irrigação estão sendo propostos para melhorar a ativação da irrigação, colaborando para sua melhor eficácia quando comparada a irrigação convencional^{33,42}.

A irrigação ultrassônica tem sido proposta como um recurso adicional na fase final do preparo do canal radicular com o objetivo de aprimorar as condições de limpeza e descontaminação das paredes e túbulos dentinários. Sistemas de irrigação ultrassônicos propiciam maior eficácia na limpeza e descontaminação dos canais radiculares, contribuindo na eliminação de microrganismos^{9,21,48}.

A irrigação ultrassônica induz fenômenos como a micro-vaporização e a cavitação, que melhoram a limpeza mecânica no SCR^{27,42}. A micro-vaporização cria um movimento de fluido intenso e circular em torno do inserto empregado, que leva a desorganização do biofilme bacteriano, por meio do poder de corte hidrodinâmico, além de aumentar o contato do irrigante com uma grande área do SCR^{14,42,49}. A cavitação cria um efeito de ondas de choque que causam o colapso das bolhas de gás criadas na agitação do agente irrigante, realizando um efeito de vácuo sob pressão para limpar áreas de complexidades anatômicas, desagregar a camada de esfregaço dos túbulos dentinários e destruir células bacterianas^{15,27}.

Dentre as técnicas que permitem potencializar a movimentação mecânica do irrigante, destaca-se a irrigação ultrassônica passiva (PUI) e a irrigação ultrassônica contínua (CUI)^{8,10,16,49}. A irrigação ultrassônica passiva (PUI) usada primeiramente por Weller et al., em 1980, utiliza energia ultrassônica que é transmitida ao irrigante através de um inserto oscilante^{16,49}. Consiste na vibração passiva (ativação ultrassônica intracanal) por meio de insertos extremamente finos e lisos, de uma solução química previamente adicionada ao canal radicular^{9,15,21,27}.

A irrigação ultrassônica contínua (CUI) permite que o irrigante seja entregue através de um inserto ultrassonicamente energizado sob um fluxo contínuo, ao invés de ser reabastecido intermitentemente a cada agitação da solução^{8,10}. A CUI facilita a introdução de irrigantes, sem a necessidade de renovação manual da solução¹⁰.

Tanto no emprego da PUI quanto no da CUI, o canal radicular já passou por alargamento prévio, permitindo que o inserto oscile livremente sem que haja toque nas paredes dentinárias. Assim a solução irrigadora penetra mais facilmente nas irregularidades anatômicas, proporcionando maior limpeza^{8,10}.

Um obstáculo inerente aos sistemas de irrigação chama especial atenção, a extrusão de detritos para os tecidos periapicais^{11,34,35}. A extrusão é esperada em maior ou menor proporção durante os procedimentos de modelagem e limpeza, por ser considerada um efeito colateral das técnicas de sanificação durante o preparo do canal radicular^{5,23}. O material extruído é composto por restos de tecido necróticos, microrganismos e seus subprodutos, fragmentos de polpa e raspas de dentina contaminada, gerando injúria aos tecidos periapicais^{11,14,31,34,35}.

Quando os tecidos periapicais são lesados, desencadeia-se uma sequência de reações químicas pelo sistema de defesa do organismo, mediando os eventos da inflamação⁴⁰. As complicações clínicas advindas da extrusão periapical de detritos podem envolver dor pós-operatória, desconforto, inchaço, danos nos tecidos periapicais e atrasos na cicatrização tecidual^{31,33}. O risco de extrusão de detritos via forame indica claramente que as questões relacionadas à irrigação do canal devem ser investigadas^{8,10}.

A extrusão de microrganismos e seus subprodutos pode gerar periodontite apical persistente ou uma resposta inflamatória aguda, conhecida como *flare-up*^{27,34,35}. O *flare-up* é o reagudecimento de um processo periapical crônico devido à quebra do equilíbrio entre as defesas do hospedeiro e a agressão microbiana vinda do canal radicular^{34,35}. Bactérias anaeróbias facultativas Gram-positivas são as mais frequentemente encontradas em casos de *flare-up*, por se tratar de uma infecção endodôntica secundária^{34,35}.

Enterococcus faecalis, bactéria Gram-positiva, é o microrganismo mais comumente associado às infecções secundárias e/ou persistentes^{23,30,34,35}. Estudos mostraram a capacidade desta bactéria de penetrar profundamente nos túbulos dentinários, multiplicando-se e criando comunidades chamadas biofilmes^{23,25,30,34,35}. Por suportarem condições adversas do meio em que se encontram, tornam-se muito resistentes e representam um problema terapêutico significativo^{27,30,44}. A resistência ocasionada pelo *Enterococcus faecalis* representa uma das principais causas de insucesso no tratamento endodôntico^{23,27}.

Visto que a agitação do irrigante é uma etapa de extrema importância na limpeza e antissepsia do SCR, é necessário que a extrusão bacteriana seja minimizada, bem como aumentada a descontaminação dos túbulos dentinários^{18,33}. Portanto, todo esforço deve ser feito a fim de se delimitar o melhor momento do emprego de diferentes técnicas de agitação do irrigante. Ainda não há relatos na literatura sobre a menor extrusão de detritos para a região periapical associada a maior descontaminação intratubular, com a utilização da PUI e da CUI.

Diante do exposto, é oportuna a realização de um trabalho avaliando a extrusão de *Enterococcus faecalis* para a região periapical e a descontaminação intratubular, utilizando-se a irrigação ultrassônica passiva e a irrigação ultrassônica contínua em diferentes momentos.

2 ARTIGOS

2 ARTIGOS

Os artigos que compõem esta dissertação foram redigidos conforme as normas de publicação da *Revista Clinical Oral Investigations* (artigo 1) e *Journal of Endodontics* (artigo 2).

2.1 Artigo 1

Título: *Protocolos de irrigação utilizando a agitação ultrassônica passiva e contínua na extrusão apical e descontaminação antimicrobiana*

Protocolos de irrigação utilizando a agitação ultrassônica passiva e contínua na extrusão apical e descontaminação antimicrobiana

O sucesso do tratamento endodôntico depende da descontaminação do sistema de canais radiculares. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito antibacteriano e a extrusão periapical oriundos de diferentes protocolos de irrigação ultrassônica do irrigante com o uso da irrigação ultrassônica passiva (PUI) e da irrigação ultrassônica contínua (CUI) em variados tempos, volumes e momentos. Metodologia: Setenta dentes unirradiculares infectados com *Enterococcus faecalis* foram usados neste estudo. Foram testados 6 diferentes protocolos de irrigação ultrassônica do irrigante com uso da PUI e da CUI. As raízes foram distribuídas em 7 grupos experimentais (n=10): grupo IC (irrigação convencional), grupo P1 (PUI em 1 momento), grupo P2 (PUI em 2 momentos), grupo C1T (CUI em 1 momento – padronização do tempo), grupo C2T (CUI em 2 momentos – padronização do tempo), grupo C1V (CUI em 1 momento – padronização do volume), grupo C2V (CUI em 2 momentos – padronização do volume). Os espécimes foram avaliados por micro-CT, contagem de colônias bacterianas extruídas e microscopia confocal de varredura a laser. Resultados: O grupo C2T mostrou uma redução significativa na descontaminação intratubular em comparação com os demais grupos ($P < 0,05$). Embora sem diferenças significativas, o uso da PUI e da CUI em 2 momentos apresentou tendência a melhorar a descontaminação dos túbulos, com maior extrusão bacteriana compatível. Conclusões: Houve tendência na redução bacteriana média quando a irrigação ultrassônica foi feita em dois momentos, independente do volume e dos tempos propostos, tanto usando PUI quanto CUI. Recomenda-se o uso do protocolo do grupo C2T, porém, mais estudos são necessários para avaliar a extrusão de detritos para a região periapical e suas implicações clínicas.

Palavras-chave: Irrigação ultrassônica passiva; irrigação ultrassônica contínua; irrigação canal radicular; redução bacteriana

INTRODUÇÃO

O sistema de canais radiculares (SCR) apresenta complexidades anatômicas, como ramificações apicais, istmos e túbulos dentinários, que podem impedir a descontaminação durante a terapia endodôntica de polpas necrosadas. Esta terapia envolve a remoção químico-mecânica de bactérias e seus subprodutos juntamente com a polpa e dentina infectada dentro deste sistema (1,2,3). As bactérias restantes, mesmo após o preparo químico-mecânico, frequentemente organizadas em estruturas semelhantes a biofilmes, influenciam o resultado do tratamento e podem estar associadas à periodontite apical persistente (2, 4).

A descontaminação do SCR era realizada, rotineiramente, através de protocolos químico-mecânicos convencionais, sem o uso de técnicas coadjuvantes na sanificação deste sistema. A grande limitação destes protocolos é a incapacidade de instrumentos e soluções antibacterianas alcançarem áreas inacessíveis do canal. A eficácia da descontaminação tridimensional do SCR em muito depende do sistema de entrega do irrigante, que deve ser eficiente (5,6). Diferentes técnicas de agitação da solução irrigadora vêm sendo propostas para melhorar a distribuição do irrigante, colaborando para atingir áreas em que apenas a irrigação convencional não era capaz (7,8).

Dentre as técnicas de irrigação propostas, destacam-se duas ativações ultrassônicas da solução, a irrigação ultrassônica passiva (PUI) e a irrigação ultrassônica contínua (CUI) (9,10), que permitem potencializar a movimentação mecânica do irrigante e contribuir na eliminação de microrganismos (5,8).

Na PUI, a solução previamente inserida no interior do canal, é agitada por insertos ultrassônicos (7) que devem trabalhar livre e não travados no conduto radicular, tocando minimamente as paredes dentinárias. A cada irrigação a solução precisa ser repostada (1,5,8). A CUI permite que o irrigante seja entregue por meio de um inserto conectado a uma comporta de fluxo contínuo, concomitante a sua agitação. Portanto, esta técnica não necessita do reabastecimento da solução a cada irrigação (9,10). Ambas as técnicas induzem fenômenos como a microcorrenteza acústica e a cavitação, que melhoram a limpeza mecânica (1) induzindo a remoção de detritos livres, proporcionando desbridamento do SCR e promovendo a ruptura dos biofilmes (9).

Uma consequência indesejada relacionada às técnicas de irrigação requer especial atenção: a extrusão de detritos para os tecidos periapicais (11). A extrusão é esperada em maior ou menor proporção durante os procedimentos de modelagem e limpeza, por ser considerada um efeito colateral das várias técnicas de sanificação do SCR (4,11,12). As complicações clínicas advindas da extrusão apical de detritos durante os procedimentos podem incluir dor pós-operatória, desconforto, inchaço, danos aos tecidos periapicais e atrasos na cicatrização tecidual (4,12).

A literatura apresenta vários protocolos bem definidos para uso de PUI (13,14), porém, é escassa em relação à padronização de uso da CUI que reduza a carga microbiana. Visto que a agitação do irrigante é uma etapa de extrema importância na descontaminação e antisepsia do SCR (14) é necessário que a extrusão bacteriana seja minimizada, aliada ao aumento da descontaminação dos túbulos dentinários. Portanto, todo esforço deve ser feito a fim de se definir o melhor protocolo dentre diferentes técnicas de irrigação ultrassônica.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a quantidade de detritos e bactérias extruídos apicalmente, além da descontaminação intratubular após os diferentes protocolos de irrigação ultrassônica passiva e ativa. A hipótese nula testada foi a de que não haveria diferença na descontaminação intratubular e na quantidade de material extruído entre os protocolos de irrigação ultrassônicos em diferentes momentos e a irrigação convencional.

MATERIAL E MÉTODOS

Seleção e preparação dos espécimes

O comitê de ética local aprovou essa pesquisa (protocolo nº 3.055.215). O cálculo dos espécimes foi realizado antes do experimento, usando o G * Power v 3.1 para Mac (Heinrich Heine, Universidade de Düsseldorf, Alemanha), selecionando o teste de Wilcoxon-Mann-Whitney do *t*-teste. O erro do tipo alfa de 0,05, o poder beta de 0,95 e a razão N2 / N1 de 1 também foram estipulados. O teste mostrou um total de 10 espécimes para cada grupo como o tamanho ideal para observar diferenças significativas. Testes pilotos foram realizados em cima do cálculo amostral. Para selecionar incisivos inferiores com características anatômicas semelhantes e permitir a distribuição equivalente dos espécimes nos grupos de acordo com o volume do

canal expresso em mm³, os espécimes foram digitalizados em um sistema de micro-CT (SkyScan 1174v2; Bruker-microCT, Kontich, Bélgica) usando 50 kV, 800 mA e uma resolução isotrópica de 19,7 µm (3,15). O volume dos canais radiculares foi calculado usando o software Ctan v. 1.12 (Bruker-microCT), e os testes de Kruskal Walls seguido de Dunn foram realizados para confirmar a distribuição uniforme entre os sete grupos ($P > 0,05$).

Os espécimes foram decoronados com discos de diamante em máquina de corte Isomet (Isomet, Buehler, Lake Bluff, Illinois, EUA) e suas raízes padronizadas em comprimento de 13mm (16). A patência do forame foi confirmada com lima tipo *Kerr* nº15 (Dentsply, Maillefer, Ballaigues, Suíça) até atingir o forame apical. O comprimento de trabalho foi estabelecido subtraindo 1mm desta medida (10,16).

Os espécimes foram instrumentadas por um único operador usando o instrumento *ProDesign Logic 25.03* acionada por um motor elétrico X-Smart Plus (Dentsply, Maillefer) até o comprimento de trabalho, de acordo com instruções do fabricante. Cada instrumento foi utilizado em 4 espécimes e depois descartado. Os canais foram irrigados com 5mL de NaOCl a 2,5%, antes e após a inserção do instrumento em cada um dos terços do canal radicular (cervical, médio e apical), totalizando 3 inserções e 20 mL no total de solução irrigante (1).

Protocolo de contaminação

Os espécimes foram submetidos a três banhos em cuba ultrassônica de 10 minutos cada, com hipoclorito de sódio a 1%, EDTA a 17%, seguidos de água destilada para neutralizar o hipoclorito de sódio. Os espécimes foram esterilizados em autoclave (Cristófoli, Campo Mourão, PR, Brasil) a 121°C por 24 minutos, inseridos em meio de cultura esterilizado BHI (Brain Heart Infusion, Difco, Detroit, Michigan, EUA) e submetidos a banho ultrassônico por 10 minutos para máxima penetração do caldo de cultura nos túbulos dentinários (17).

A cepa de referência bacteriana de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) foi adquirida, sendo a morfologia colonial e a coloração de Gram verificadas para confirmar sua pureza várias vezes ao longo do experimento. Os microrganismos foram cultivados em caldo BHI com subculturas sucessivas. As diluições foram feitas com base no valor de absorbância, obtido pelo espectrofotômetro SF325NM (Bel Photonics do Brasil Ltda, Osasco, Brasil), para ajuste a uma concentração de

3×10^8 UFC / mL. Os espécimes foram contaminados em um período de 5 dias, em meio BHI a 37°C, seguindo a sequência de centrifugações de Ma et al. (2011) (18) e protocolo de Andrade et al. (2015) (17).

Controle da descontaminação da superfície externa

As raízes tiveram sua superfície externa descontaminadas com água oxigenada a 30% por um minuto, seguida por NaOCl a 2,5% por um minuto. Por fim, o NaOCl foi neutralizado com tiosulfato de sódio a 5% por um minuto (20). Amostras de controle da descontaminação foram coletadas da superfície apical externa de cada raiz, utilizando pontas de papel absorventes esterilizadas esfregadas por toda a superfície radicular durante um minuto. As pontas foram colocadas em microtubos (Axigen® São Paulo, São Paulo, Brasil) com 1mL de caldo BHI, para posteriores diluições e semeadura de seus conteúdos em placas de ágar BHI, com objetivo de controle da efetividade da descontaminação da superfície externa de cada raiz.

Instrumentação e protocolos de irrigação

Todos os procedimentos experimentais foram realizados no interior de câmara de fluxo laminar (Esco, Arstream, classe II A2, Jacari, São Paulo, Brasil).

A porção apical das raízes foram introduzidas em microtubos através de furos em suas tampas, sendo fixadas com cera 7, contendo gel de agarose esterilizado a 1,5% (Difco) recém preparado, ainda não solidificado, levemente aquecido à aproximadamente 45°C. O ágar teve como objetivo recobrir o ápice radicular e fornecer uma matriz que simulasse o ligamento periodontal e capturasse o conteúdo extruído dos canais (19,20). Todos os materiais foram esterilizados previamente.

Os espécimes foram divididos em 7 grupos (n=10), onde 6 grupos receberam irrigação ultrassônica. Um espécime de cada grupo não foi submetido ao protocolo de tratamento, sendo o controle positivo para o crescimento intratubular bacteriano.

Os canais foram preparados com um instrumento X1 – Blue (40.06) (MK LIFE, Medical and Products, Brasil), alimentado por um motor elétrico X-Smart Plus (Dentsply, Maillefer) em cinemática recíprocante (configuração Reciproc) e movimento de “pecking–motion”. Foi realizada a instrumentação por terços (cervical, médio e apical), totalizando 3 inserções, até o comprimento de trabalho. Após seu uso em cada 1/3, o instrumento foi limpo com uma gaze esterilizada. O instrumento

empregado foi padronizado (40.06) devido à conicidade e diâmetro naturais dos canais influenciarem na eficácia da irrigação ultrassônica na remoção de detritos (7). Os instrumentos utilizados foram esterilizados para uso em outro dente e após quatro vezes de uso foram descartados.

O irrigante foi água destilada esterilizada, solução inerte que não causa efeitos falso-positivos na descontaminação bacteriana. Os canais foram irrigados com 5mL de solução antes da inserção do instrumento e após a inserção em cada um dos terços do canal radicular (cervical, médio e apical), totalizando 3 inserções e 20 mL de solução irrigante no total (1). A irrigação foi realizada com uma seringa descartável de 5 mL e ponta de irrigação 29Ga (NaviTips; Ultradent, South Jordan, UT, EUA).

Para todas as agitações ultrassônicas utilizou-se a unidade ultrassônica Ultrawave Xs (Ultradent, EUA)(14) na potência 4 com inserto ultrassônico NitiSonic (Ultradent) com ponta 0,2mm e taper 0,02.(16). Este aparelho, quando aberto em sua comporta máxima, fornece um fluxo contínuo de irrigação de 50mL/min. O inserto ultrassônico foi movido no sentido do achatamento. Na irrigação ultrassônica passiva (PUI), foi realizada a agitação durante um total de um minuto (1,5). Já na CUI, por ser dispensado um maior volume durante a agitação, padronizou-se o tempo primeiramente e, depois, o volume do irrigante, em grupos separados para avaliação da descontaminação intratubular e a extrusão de resíduos e bactérias.

Grupo IC (Irrigação convencional): Os espécimes receberam 20 mL de solução irrigante no total, por meio de seringa convencional. Não recebeu irrigação ultrassônica.

Grupo P1 (PUI em 1 momento): PUI realizada 2mm aquém do comprimento de trabalho após a instrumentação completa da raiz, por 3 ciclos de 20 segundos e renovação de 5mL a cada ciclo, totalizando 15 mL de irrigante dispensados durante a ativação.

Grupo P2 (PUI em 2 momentos): Após instrumentação do terço cervical, realizou-se PUI apenas nesse terço. Posteriormente ao restante do preparo mecânico, no comprimento de trabalho, foi realizada novamente a PUI a 2mm aquém desse CT.

Ambos momentos da PUI foram de 3 ciclos de 20 segundos com renovações de 5mL a cada ciclo, totalizando 30 mL de irrigante.

Grupo C1T (CUI em 1 momento – Padronização do tempo): CUI realizada 2mm aquém do comprimento de trabalho após a instrumentação completa da raiz, por 3 ciclos de 20 segundos, totalizando 50 mL de irrigante dispensados durante a ativação.

Grupo C2T (CUI em 2 momentos – Padronização do tempo): CUI realizada no 1/3 cervical após a instrumentação deste terço radicular e a 2mm aquém do comprimento de trabalho após a instrumentação completa da raiz, por 3 ciclos de 20 segundos em cada terço, totalizando 100 mL de irrigante dispensados durante a ativação.

Grupo C1V (CUI em 1 momento – Padronização do volume): CUI realizada 2mm aquém do comprimento de trabalho após a instrumentação completa da raiz, por 3 ciclos de 6 segundos, totalizando 15 mL de irrigante dispensados durante a ativação.

Grupo C2V (CUI em 2 momentos – Padronização do volume): CUI realizada no 1/3 cervical após a instrumentação deste terço radicular e a 2mm aquém do comprimento de trabalho após a instrumentação completa da raiz, por 3 ciclos de 6 segundos em cada terço, totalizando 30 mL de irrigante dispensados durante a ativação.

Figura 1. Divisão dos grupos experimentais

Análise volumétrica em micro-CT de detritos dentinários extruídos

Os espécimes foram digitalizados em um micro-CT (SkyScan 1174.v2; Bruker-microCT, Kontich, Bélgica) a 50 Kv, 800 mA, a uma resolução isotrópica de 17 μm , e 180° ao redor do eixo vertical. Após a digitalização, as imagens foram reconstruídas usando o software NRecon v.1.6.9 (Bruker-microCT). Em seguida, a análise quantitativa tridimensional do volume de detritos extruídos foi realizada usando o software CTAn v1.5.4.0 (Bruker-microCT). O operador foi cegado durante a varredura e análise (20).

Avaliação microbiológica: quantidade de UFC/mL extruídos

Após a digitalização por micro-CT, o microtubo contendo o gel de agarose foi aberto e, em condições assépticas, realizadas coletas do conteúdo extruído. A coleta foi feita dispensando 50 microlitros de água destilada esterilizada sob o gel de agarose solidificado, homogeneizado através da pipeta (podemos colocar a marca da pipeta aqui, valoriza o trabalho) e então removidos para inserção em caldo BHI. À partir desta coleta, realizaram-se diluições em microtubos contendo BHI, semeadura em

placas de ágar BHI, incubação a 37°C durante 48 horas e contagem das unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) de *Enterococcus faecalis*. O valor obtido foi convertido em Log 10, conforme descrito anteriormente por Vasconcelos et al (21).

Avaliação da viabilidade bacteriana intradentinária pela microscopia confocal de varredura a laser (MCVL)

Os espécimes foram seccionados longitudinalmente usando uma máquina de corte Isomet (Isomet, Buehler, Lake Bluff, Illinois, EUA), com um disco de diamante resfriado com solução salina esterilizada. A camada de esfregaço produzida por este corte nos espécimes foi removida com 2,5 mL de EDTA a 17% por 3 min e lavados com solução salina esterilizada. Os espécimes foram corados com 30 µL de corante de viabilidade bacteriana LIVE/ DEAD® Bac Light™ (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA) por 20 minutos. Este kit contém o corante SYTO 9®, que marca as bactérias viáveis com um pigmento verde, e corante iodeto de propídio, que marca as mortas com um pigmento vermelho permitindo, assim, que bactérias viáveis sejam facilmente identificadas. Os espécimes foram examinados com um microscópio confocal de varredura a laser Leica TCS-SPE invertido (Leica Microsystems GmbH, Mannheim, Baden-Württemberg, Alemanha) usando uma lente de ampliação de 40X, com óleo de imersão. As imagens foram obtidas com passo de 1 µm até aproximadamente 15 µm de profundidade (3D), no formato de 1024 × 1024 pixels. Para uma análise objetiva, as imagens MCVL foram convertidas no formato "tiff" pelo software LAS AF e analisadas com o software bioImageL™ v2 (21).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

A normalidade entre os grupos foi observada pelo teste de Shapiro-Wilk e como a distribuição dos dados não foi paramétrica utilizou-se os testes de Kruskal-Wallis seguido de Dunn para comparação entre os grupos. Utilizou-se o software Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, EUA) como ferramenta analítica, e o nível de significância foi estabelecido em 5%.

RESULTADOS

Avaliação volumétrica da extrusão

Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos na avaliação do volume de extrusão e detritos, por meio do micro CT ($P > 0,05$). (Tabela 1). A Figura 2 exemplifica um espécime com material extruído evidenciado na microtomografia.

Avaliação da cultura microbiológica

Os dados quantitativos (log das unidades formadoras de colônias por mL) das bactérias extruídas em cada grupo são mostradas na Tabela 2. Houve similaridade entre a maioria dos grupos sem diferenças significantes. No entanto, o grupo IC mostrou valores significativamente inferiores aos grupos C2T; C1V e C2V, quanto à extrusão bacteriana periapical ($P < 0,05$).

Análise microbiológica por microscopia confocal de varredura a laser (MCVL)

Todos os controles positivos demonstraram crescimento bacteriano após o intervalo de tempo experimental. A análise por MCVL mostrou que de acordo com a viabilidade bacteriana detectada nas imagens, o grupo C2T (CUI em dois momentos com padronização do tempo) apresentou menor porcentagem de bactérias vivas, com diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$) em relação aos grupos P1; C1T; C1V; C2V E IC. Os demais grupos, exceto C1V (CUI em um momento, padronização do volume), apresentaram diferenças estatísticas em relação ao IC (irrigação convencional) ($P < 0,05$), ou seja, maior descontaminação dos túbulos. O grupo P2 (PUI em dois momentos) mostrou diferença estatisticamente significativa com o C1V (CUI em um momento, padronização do volume). Também o grupo C2V (CUI em dois momentos, padronização do volume) eliminou mais bactérias, resultado estatisticamente significativo, quando comparado com o C1V. Houve diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) entre todos os grupos e o controle positivo (Fig. 3). De acordo com a Tabela 3, a ordem do grupo mais efetivo para o

menos quanto à descontaminação intratubular, por seus valores de mediana, foi: C2T > P2 > P1 > C2V > C1T > IC > C1V > C+. A Figura 2 exemplifica algumas imagens dos grupos estudados em MCVL, mostrando bactérias nos túbulos coradas em verde (viáveis) ou vermelho (bactérias mortas)

Tabela 2- Mediana, contagem bacteriana mínima e máxima da avaliação da cultura microbiológica extruída apicalmente (UFC/mL), média e desvio padrão, em cada grupo experimental.

GRUPOS	MÉDIA Log 10 INICIAL	MÉDIA Log 10 EXTRUSÃO	% EXTRUSÃO Mediana (min-max)
IC	6,76	5,58	83,46 (77,03 – 86,79) ^a
P1	6,84	6,32	90,27 (74,86 - 96,84) ^{a,b}
P2	6,86	6,16	90,96 (78,27 – 95,23) ^{a,b}
C1T	6,76	6,09	88,32 (82,79 - 92,86) ^{a,b}
C2T	6,83	6,10	93,97 (78,83 – 98,37) ^b
C1V	6,76	6,34	94,27 (89,54 – 97,36) ^b
C2V	6,83	6,31	91,9 (86,83 – 99,53) ^b

* Letras diferentes determinam diferença significativa entre os grupos, pelo teste de Kruskal-Wallis seguido de Dunn.

Tabela 1- Média, desvio-padrão, mediana e valores mínimos e máximos do volume de detritos extruídos (em milímetros cúbicos)

GRUPOS	MÉDIA (DP)	MEDIANA (min– max)
IC	0 (0)	0
P1	0,34 (0,28)	0,40 (0,04 – 0,59) ^a
P2	0,14 (0,08)	0,13 (0,01 – 0,25) ^a
C1T	0,13 (0,09)	0,13 (0,06 – 0,20) ^a
C2T	0,03 (0,05)	0,03 (0,02 – 0,07) ^a
C1V	0,23 (0,06)	0,23 (0,18 – 0,27) ^a
C2V	0,16 (0,10)	0,10 (0,09 – 0,28) ^a

* Letras diferentes determinam diferença significativa entre os grupos, pelo teste de Kruskal-Wallis seguido de Dunn.

Figura 2: Imagem em micro-CT representativa de espécime demonstrando o detrito dentinário extruído via forame apical

Tabela 3. Viabilidade bacteriana: Análise de Kruskal-wallis, seguido de Dunn a partir da análise de variância unidirecional mostra a diferença de mediana, valores máximos e mínimos, média e desvio padrão de bactérias vivas

Grupos	Média (DP)	Mediana (min– max)
C+	76,66 (30,92)	98,38 (3,21 – 100) ^a
IC	51,59 (34,27)	49,02 (2,21 – 98,12) ^b
P1	32,30 (36,61)	12,34 (0,04 – 100) ^c
P2	28,86 (34,49)	7,48 (0,01 – 98,53) ^{c,d}
C1T	32,62 (29,04)	25,49 (0,05– 99,11) ^c
C2T	13,39 (18,55)	3,63 (0 – 87,93) ^d
C1V	51,50 (37,36)	60,60 (0,03 – 99,89) ^{b,c}
C2V	31,92 (34,05)	18,36 (0 – 99,92) ^c

* Letras diferentes determinam diferença significativa entre os grupos, pelo teste de Kruskal-Wallis seguido de Dunn.

Figura 3: Imagens dos túbulos dentinários obtida por microscopia confocal de varredura a laser após os protocolos instituídos. **C+:** Controle Positivo, **IC:** Irrigação Convencional, **P1:** PUI em um momento, **P2:** PUI em dois momentos, **C1T:** CUI em um momento padronizando-se o tempo, **C2T:** CUI em dois momentos padronizando-se o tempo, **C1V:** CUI em um momento padronizando-se o volume, **C2V:** CUI em dois momentos padronizando-se o volume.

DISCUSSÃO

O presente estudo comparou a eficácia antimicrobiana e extrusão de detritos contaminados da PUI e da CUI em um ou dois momentos em dentes contaminados com *Enterococcus faecalis*. Ainda, comparou os mesmos efeitos quando a CUI foi utilizada padronizando-se tempo ou o volume do irrigante.

Todas as propostas de uso da PUI e da CUI demonstraram melhoras estatisticamente significantes na redução da contaminação intratubular quando comparados com a irrigação convencional, (7,22) exceto no grupo C1V, refutando parcialmente a primeira hipótese nula. Os resultados obtidos sugerem que o efeito da irrigação ultrassônica sobre as bactérias é influenciado pelo fluxo do irrigante e tempo de uso do inserto, indo de encontro com outros achados da literatura (23,24).

O protocolo proposto no grupo C2T (CUI em dois momentos, com padronização do tempo) obteve os melhores resultados, apresentando diferenças estatisticamente significantes com todos os grupos, exceto P2, o qual também se empregou a irrigação ultrassônica em dois momentos. Apesar de não estatisticamente significativa, foi observada menor porcentagem média de bactérias vivas nos grupos C2T; P2; C2V, onde a CUI e a PUI foram utilizadas em dois momentos distintos, com diferentes tempos e volumes empregados. Nossos achados enfatizam que um aliado essencial ao tempo de uso do inserto e ao volume dispensado é a irrigação ultrassônica em dois momentos distintos (terço cervical e terzo apical), evidenciando a importância do esvaziamento progressivo, da técnica “crown-down” também no procedimento de irrigação. A agitação logo após a limpeza no terzo cervical é interessante, considerando que este terzo radicular é o mais contaminado por haver maior número e diâmetro dos túbulos dentinários e por estar mais perto do processo carioso (precisaríamos de uma referência aqui).

O uso da PUI e da CUI em 2 momentos foi preponderante na tendência a melhorar a descontaminação intratubular, o que faz bastante sentido, uma vez que há mais limpeza. Os grupos utilizando a irrigação ultrassônica ativa ou passiva em apenas um momento tiveram redução intratubular bacterianas menores.

Ao se padronizar a CUI pelo tempo fixo de irrigação, os resultados tenderam a ser melhores, porque a vazão ou taxa de fluxo de irrigante na CUI é maior e portanto, maior limpeza decorrente. Já quando se padronizou a CUI pelo volume fixo,

observou-se que o tempo dispendido foi bem menor no ato da irrigação e assim, uma tendência de os resultados serem menos promissores quanto à descontaminação intratubular.

Nas condições clínicas, espera-se que a maioria das bactérias extruídas via forame apical estejam mortas devido ao uso de um irrigante antibacteriano, como o NaOCl (7). Neste estudo, água destilada esterilizada (20,25) foi usada para permitir comparações diretas entre os efeitos mecânicos dos diferentes protocolos de irrigação propostos, sem a variável de um irrigante antibacteriano. Quase todas as pesquisas que avaliam extrusão de detritos, utilizam irrigantes inócuos para eliminar este viés (26,27,28) .

Utilizou-se também um modelo experimental semelhante a estudos anteriores (17, 19), que consiste na raiz submersa em gel que simula os tecidos periapicais e, portanto, evita a extrusão passiva de irrigantes por criar um sistema de canal fechado. No entanto, não se sabe se a resistência exercida pelo gel é menor, maior ou igual à exercida pelos tecidos periapicais *in vivo* (19). No entanto, deve-se considerar que o modelo é idêntico para todos os grupos, permitindo a comparação de seus resultados.

Os resultados de UFC/mL no periápice demonstraram não haver diferenças estatisticamente significantes entre os protocolos de uso da CUI e da PUI. Apenas os grupos C2T, C1V e C2V, todos utilizando a CUI, lançaram significativamente mais bactérias para o periápice quando comparado ao grupo IC, portanto, a segunda hipótese nula foi parcialmente aceita. Estes resultados vão em direção contrária aos achados de estudo anterior, que mostra a extrusão do irrigante significativamente maior para a região periapical após o uso da PUI quando comparada a irrigação convencional (22). A divergência entre os estudos pode estar associada a diferenças metodológicas.

Imagens por micro-CT também foram utilizadas para detectar e quantificar detritos dentinários extruídos apicalmente coletados no gel de agarose. As vantagens desta técnica são: discernir o tecido duro (debris) extruído para a região periapical, permitindo comparações de volume entre os grupos estudados e a possibilidade de quantificar os debris na mesma amostra que vai ser analisada microbiologicamente. A análise por micro-CT mostrou que os grupos produziram

uma frequência e volume semelhantes de detritos dentinários extruídos apicalmente, sem diferenças estatisticamente significantes entre eles. A extrusão bacteriana foi mais frequente que a extrusão de detritos. Além disso, não foi observada correlação entre o volume de detritos extruídos e a contagem de UFC/mL extruídas, indo de acordo com os achados de trabalho anterior (20). Sugere-se que detritos podem ser compactados em irregularidades do canal radicular, o que limita a extrusão apical (15).

PUI e a CUI induzem 2 fenômenos que potencializam a descontaminação mecânica dos SCR: transmissão acústica e cavitação. A primeira leva ao estresse de cisalhamento das células bacterianas e a segunda causa o colapso das bolhas de gás, criando um efeito de vácuo de pressão para limpar a parede do canal radicular de forma físico-mecânica e destruir as células bacterianas (1,7). Além desses atributos positivos, o estudo ainda mostrou que quando a PUI e CUI foram utilizadas em dois momentos, permitiu uma tendência a melhorar a descontaminação intratubular, sem diferenças estatisticamente significantes na extrusão periapical, quando comparadas entre si.

Considerando não existir uma norma de padronização entre os aparelhos de ultrassom quanto a razão de fluxo, é necessário uma calibração inicial pelo endodontista, verificando qual o tempo necessário para vazão do volume ideal do irrigante.

CONCLUSÃO

Pode-se concluir que melhora na redução bacteriana intratubular quando a irrigação ultrassônica foi feita em dois momentos, independente do volume e dos tempos propostos. Recomenda-se o uso do protocolo do grupo C2T (irrigação ultrassônica contínua em dois momentos, padronizando o tempo maior), uma vez que não houve extrusão de detritos pra a região periapical de forma significativa. Estudos clínicos randomizados com avaliação de dor são sugeridos para sanar dúvidas em relação aos efeitos da extrusão de detritos contaminados.

REFERÊNCIAS

1. Pladisai P, Ampornaramveth RS, Chivatxaranukul P. Effectiveness of Different Disinfection Protocols on the Reduction of Bacteria in *Enterococcus faecalis* Biofilm in Teeth with Large Root Canals. *J Endod* 2016;42(3):460-4.
 2. Orozco EIF, Toia CC, Cavalli D, Khoury RD, Cardoso FGDR, Bresciani E, Valera MC. Effect of passive ultrasonic activation on microorganisms in primary root canal infection: a randomized clinical trial. *J Appl Oral Sci* 2019;28:e20190100.
 3. Versiani MA, Alves FR, Andrade-Junior CV, Marceliano-Alves MF, Provenzano JC, Rôças IN, Sousa-Neto MD, Siqueira JF Jr. Micro-CT evaluation of the efficacy of hard-tissue removal from the root canal and isthmus area by positive and negative pressure irrigation systems. *Int Endod J* 2016;49(11):1079-1087.
 4. Siqueira JF Jr. Microbial causes of endodontic flare-ups. *Int Endod J* 2003;36(7):453-63. Review.
 5. Karade P, Chopade R, Patil S, Hoshing U, Rao M, Rane N, Chopade A, Kulkarni A. Efficiency of Different Endodontic Irrigation and Activation Systems in Removal of the Smear Layer: A Scanning Electron Microscopy Study. *Iran Endod J* 2017;12(4):414-418.
 6. Siqueira JF Jr, Rôças IN, Favieri A, Machado AG, Gahyva SM, Oliveira JC, Abad EC. Incidence of postoperative pain after intracanal procedures based on an antimicrobial strategy. *J Endod* 2002;28(6):457-60.
 7. Van der Sluis LW, Versluis M, Wu MK, Wesselink PR. Passive ultrasonic irrigation of the root canal: a review of the literature. *Int Endod J* 2007;40(6):415-26
 8. Karatas E, Ozsu D, Arslan H, Erdogan AS. Comparison of the effect of nonactivated self-adjusting file system, Vibringe, EndoVac, ultrasonic and needle irrigation on apical extrusion of debris. *Int Endod J* 2015;48(4):317-22.
-

9. Alturaiki S, Lamphon H, Edrees H, Ahlquist M. Efficacy of 3 different irrigation systems on removal of calcium hydroxide from the root canal: a scanning electron microscopic study. *J Endod* 2015;41(1):97-101.
 10. Castelo-Baz PC, Martín-Biedma B, Cantatore G, Ruíz-Piñón M, Bahillo J, Rivas-Mundiña B, Varela-Patiño P. In vitro comparison of passive and continuous ultrasonic irrigation in simulated lateral canals of extracted teeth. *J Endod* 2012;38(5):688-91.
 11. Borges AH, Pereira TM, Porto AN, Estrela CRA, Miranda FLP, Aranha AM, Guedes OA. The Influence of Cervical Preflaring on the Amount of Apically Extruded Debris after Root Canal Preparation Using Different Instrumentation Systems. *J Endod* 2016;42(3):465-9.
 12. Romualdo PC, de Oliveira KMH, Nemezio MA, Kuchler EC, Silva RAB, Nelson-Filho P, Silva LAB. Does apical negative pressure prevent the apical extrusion of debris and irrigant compared with conventional irrigation? A systematic review and meta-analysis. *Aust Endod J* 2017;43(3):129-137.
 13. Varela P, Souza E, de Deus G, Duran-Sindreu F, Mercadé M. Effectiveness of complementary irrigation routines in debriding pulp tissue from root canals instrumented with a single reciprocating file. *Int Endod J* 2019;52(4):475-483.
 14. Sasanakul P, Ampornaramveth RS, Chivatxaranukul P. Influence of Adjuncts to Irrigation in the Disinfection of Large Root Canals. *J Endod* 2019;45(3):332-337.
 15. Leoni GB, Versiani MA, Pécora JD, Damião de Sousa-Neto M. Micro-computed tomographic analysis of the root canal morphology of mandibular incisors. *J Endod* 2014;40(5):710-6.
 16. Machado ME, Nabeshima CK, Leonardo MF, Reis FA, Britto ML, Cai S. Influence of reciprocating single-file and rotary instrumentation on bacterial reduction on infected root canals. *Int Endod J* 2013;46(11):1083-7.
-

17. Andrade FB, Arias MP, Maliza AG, Duarte MA, Graeff MS, Amoroso-Silva PA, Midená RZ, Moraes IG. A new improved protocol for in vitro intratubular dentinal bacterial contamination for antimicrobial endodontic tests: standardization and validation by confocal laser scanning microscopy. *J Appl Oral Sci* 2015;23(6):591-8.
 18. Ma J, Wang Z, Shen Y, Haapasalo M. A new noninvasive model to study the effectiveness of dentin disinfection by using confocal laser scanning microscopy. *J Endod* 2011;37(10):1380-5.
 19. Jamleh A, Suda H, Adorno CG. Irrigation effectiveness of continuous ultrasonic irrigation system: An ex vivo study. *Dent Mater J* 2018;30;37(1):1-5.
 20. Alves FRF, Paiva PL, Marceliano-Alves MF, Cabreira LJ, Lima KC, Siqueira JF Jr, Rôças IN, Provenzano JC. Bacteria and Hard Tissue Debris Extrusion and Intracanal Bacterial Reduction Promoted by XP-endo Shaper and Reciproc Instruments. *J Endod* 2018;44(7):1173-1178.
 21. Vasconcelos LRSM, Midená RZ, Minotti PG, Pereira TC, Duarte MAH, Andrade FB. Effect of ultrasound streaming on the disinfection of flattened root canals prepared by rotary and reciprocating systems. *J Appl Oral Sci* 2017;25(5):477-482.
 22. İriboz E, Bayraktar K, Türkaydın D, Tarçın B. Comparison of apical extrusion of sodium hypochlorite using 4 different root canal irrigation techniques. *J Endod* 2015;41(3):380-4.
 23. Latham J, Fong H, Jewett A, Johnson JD, Paranjpe A. Disinfection Efficacy of Current Regenerative Endodontic Protocols in Simulated Necrotic Immature Permanent Teeth. *J Endod* 2016;42(8):1218-25.
 24. Distel JW, Hatton JF, Gillespie MJ. Biofilm formation in medicated root canals. *J Endod* 2002;28(10):689-93.
-

25. Desai P, Himel V. Comparative safety of various intracanal irrigation systems. *J Endod* 2009;35(4):545-9
 26. Capar ID, Arslan H, Akcay M, et al . An in vitro comparison of apically extruded debris and instrumentation times with ProTaper Universal, ProTaper Next, Twisted File Adaptive, and HyFlex instruments. *J Endod*. 2014;40(10):1638-41.
 27. De-Deus G, Marins J, Silva EJ, et al. Accumulated hard tissue debris produced during reciprocating and rotary nickel-titanium canal preparation. *J Endod*. 2015;41(5):676-81
 28. Kirchhoff AL, Fariniuk LF, Mello I. Apical Extrusion of Debris in Flat-oval Root Canals after Using Different Instrumentation Systems. *J Endod*. 2015;41(2):237-41.
-
-

2 ARTIGO

O artigo que compõe esta dissertação foi redigido conforme as normas de publicação da *Revista Journal of Endodontics*.

2.1 Artigo 2

Título: Influência na redução bacteriana e extrusão periapical por protocolos de irrigação ultrassônica passiva **em diferentes terços e posições dentárias**

Influência na redução bacteriana e extrusão periapical por protocolos de irrigação ultrassônica passiva em diferentes terços e posições dentárias

O tratamento endodôntico bem-sucedido requer a redução das bactérias nos canais radiculares em um nível que estabeleça um ambiente adequado para a cura periapical. Os objetivos deste estudo foram avaliar a eficácia dos métodos da PUI e determinar qual o protocolo mais promissor para a maior descontaminação intratubular e menor extrusão periapical. Métodos: Raízes de incisivos inferiores foram infectadas com *Enterococcus faecalis* e divididas em 5 grupos sob protocolos da PUI (n=10): PUIC (PUI no terço cervical), PUIA (PUI no terço apical), PUICA (PUI no terço cervical e apical – dentes na posição inferior), PUICAS (PUI no terço cervical e apical – dentes na posição superior), Grupo IC (irrigação convencional). Os debris extruídos durante os protocolos de irrigação foram mensurados volumetricamente por microtomografia computadorizada (micro-CT). Posteriormente, unidades formadoras de colônias bacterianas extruídas (UFC/mL) foram determinadas e os espécimes analisados em MCVL. Como resultados, os grupos PUICA e PUICAS, seguidos por PUIA mostraram uma redução significativa na descontaminação intratubular ($P < 0,05$). Os protocolos sugeridos por PUICA e PUICAS, também mostraram maior tendência na extrusão periapical de bactérias, não havendo diferenças entre si. Pode-se concluir que todos os protocolos de irrigação foram associados à extrusão bacteriana periapical. e onde se utilizou a PUI em dois momentos houve significativa redução na carga bacteriana intratubular. Recomenda-se a utilização dos protocolos PUICA e PUICAS para maior redução da carga bacteriana.

Palavras-chave: Irrigação ultrassônica passiva; irrigação convencional do canal radicular; extrusão bacteriana

INTRODUÇÃO

Os microrganismos e seus subprodutos tóxicos desempenham um papel crítico no início e no desenvolvimento da pulpite e periodontite apical (1). A saída de subprodutos bacterianos do sistema de canais radiculares (SCR) infectados para os tecidos perirradiculares leva às lesões periapicais, caracterizadas pela resposta inflamatória na liberação de mediadores químicos (2,3).

Devido à complexidade anatômica dos dentes, um preparo químico-mecânico completo raramente é alcançado (4,5). Embora a instrumentação mecânica combinada com a administração passiva do irrigante através de seringas e agulhas seja capaz de reduzir significativamente populações microbianas, os microrganismos remanescentes ainda são identificados em 38-54% nesses canais radiculares (1). As bactérias restantes, frequentemente organizadas em estruturas semelhantes a biofilmes, influenciam o resultado do tratamento e podem estar associadas à periodontite apical persistente (5).

Tanto para a desinfecção quanto para o amplo desbridamento do SCR, a irrigação é parte essencial para se obter êxito (6,7). A irrigação convencional com seringas é a técnica básica para irrigação do canal radicular, e a profundidade da colocação da ponta da agulha no interior do canal é o fator que permite a entrega da solução, mas limita muito sua distribuição. Abordagens alternativas incluindo um sistema de irrigação que melhore a distribuição do irrigante através da ativação ultrassônica vêm sendo usadas (7).

A irrigação ultrassônica passiva (PUI) é um sistema de irrigação que depende da transmissão de energia acústica de um inserto oscilante para um irrigante no espaço do canal radicular por meio de ondas ultrassônicas (6,7). A solução, previamente inserida no interior do canal, é agitada por insertos ultrassônicos que devem trabalhar soltos no conduto radicular, tocando minimamente as paredes dentinárias e a cada agitação a solução precisa ser reabastecida (8,9).

Uma consequência relacionada às técnicas de irrigação chama especial atenção: a extrusão de detritos (microrganismos e restos necróticos) para os tecidos

periapicais (10). Protocolos de irrigação ultrassônica podem afetar a frequência e a quantidade de detritos extruídos apicalmente (6). A extrusão de detritos e soluções de irrigação podem ser as principais causas de exacerbação inflamatória, possibilitando o acometimento de dor intensa, sensação de queimação, edema e atraso na cicatrização dos tecidos periapicais (11).

A PUI vem sendo empregada como agitação da solução final após a instrumentação (12,13). Com toda a atenção que a irrigação ultrassônica passiva ganhou na endodontia, levando em consideração a importância da distribuição do irrigante para o SCR (3,14), é necessário um protocolo diferenciado que garanta um melhor alcance do irrigante aliado a menor extrusão bacteriana na região periapical.

Os efeitos de diferentes protocolos com o uso da PUI não foram relatados. Portanto, o objetivo deste estudo foi comparar a quantidade de bactérias extruídas apicalmente, além da descontaminação intratubular em canais radiculares contaminados com *Enterococcus faecalis*, em diferentes terços e momentos do uso da PUI e entre dentes em posição de arco superior e inferior. A hipótese nula testada foi a de que não haveria diferença na redução da descontaminação intratubular e quantidade de bactérias extruídas entre os protocolos de irrigação ultrassônicos e a irrigação convencional.

MATERIAL E MÉTODOS

Seleção e preparação dos espécimes

O comitê de ética local aprovou essa pesquisa (protocolo nº 3.055.215). O cálculo dos espécimes foi realizado antes do experimento, usando o G * Power v 3.1 para Mac (Heinrich Heine, Universidade de Düsseldorf). O teste mostrou um total de 10 espécimes para cada grupo como o tamanho ideal para observar diferenças significativas. Testes pilotos foram realizados utilizando o número sugerido no cálculo amostral. Para selecionar-se incisivos inferiores com características anatômicas semelhantes e permitir a distribuição equivalente dos espécimes nos grupos de acordo com o volume do canal expresso em mm³, os espécimes foram digitalizados em um sistema de micro-CT (SkyScan 1174v2; Bruker-microCT, Kontich, Bélgica) usando 50 kV, 800 mA e uma resolução isotrópica de 19,7 µm

(15,16). O volume dos canais radiculares foi calculado usando o software Ctan v. 1.12 (Bruker-microCT), e os testes Kruskal Walls seguido de Dunn foram realizados para confirmar a distribuição uniforme entre os sete grupos ($P > 0,05$).

Os espécimes foram decoronados com discos de diamante em máquina de corte Isomet (Isomet, Buehler, Lake Bluff, Illinois, EUA) e suas raízes padronizadas em comprimento de 13mm (17). A patência do forame foi confirmada com lima tipo *Kerr* nº15 (Dentsply, Maillefer, Ballaigues, Suíça) até atingir o forame apical. O comprimento de trabalho foi estabelecido subtraindo 1mm desta medida (7,17).

Os espécimes foram instrumentados por um único operador usando o instrumento ProDesign *Logic 25.03* acionado por um motor elétrico X-Smart Plus (Dentsply, Maillefer) até o comprimento de trabalho, de acordo com instruções do fabricante.

Protocolo de contaminação

Os espécimes foram submetidos a três banhos em cuba ultrassônica de 10 minutos cada, com hipoclorito de sódio a 1%, EDTA a 17%, seguidos de água destilada para neutralizar o hipoclorito de sódio. Os espécimes foram esterilizados em autoclave (Cristófoli, Campo Mourão, PR, Brasil) a 121°C por 24 minutos, inseridos em meio de cultura esterilizado BHI (Brain Heart Infusion, Difco, Detroit, Michigan, EUA) e submetidos a banho ultrassônico por 10 minutos para máxima penetração do caldo de cultura nos túbulos dentinários (18).

A cepa de referência bacteriana de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) foi adquirida e a morfologia colonial e a coloração de Gram foram verificadas para confirmar sua pureza várias vezes ao longo do experimento. Os microrganismos foram cultivados em caldo BHI com culturas sucessivas. As diluições foram feitas com base no valor de absorbância, obtido pelo espectrofotômetro SF325NM (Bel Photonics do Brasil Ltda, Osasco, Brasil), para uma concentração de 3×10^8 UFC/mL. Os espécimes foram contaminados em um período de 5 dias, em meio BHI a 37°C, seguindo Ma et al. (2011) (19) na sequência de centrifugações e Andrade et al. (2015) no protocolo (18).

Controle da descontaminação da superfície externa

As raízes tiveram sua superfície externa descontaminadas dentro de câmara de fluxo laminar com água oxigenada a 30% por um minuto, em seguida em NaOCl

a 2,5% por um minuto e neutralização com tiosulfato de sódio a 5% por um minuto (20). Amostras de controle da descontaminação foram coletadas da superfície apical externa de cada raiz, utilizando pontas de papel absorvente esterilizadas esfregadas por toda a superfície radicular por um minuto. As pontas foram colocadas em microtubo (Axigen® São Paulo, São Paulo, Brasil) com 1mL de caldo BHI, para posteriores diluições e semeadura de seus conteúdos em placas de ágar BHI, com objetivo de controle da efetividade da descontaminação da superfície externa de cada raiz.

Instrumentação e protocolos de irrigação

A porção apical das raízes foram introduzidas em microtubos através de furos em suas tampas, sendo fixadas com cera 7 contendo gel de agarose esterilizado a 1,5% (Difco) recém preparado, ainda não solidificado, levemente aquecido à aproximadamente 45°C. O ágar teve como objetivo recobrir o ápice radicular e fornecer matriz que simulasse o ligamento periodontal e capturasse o conteúdo extruído dos canais (20). Todos os materiais foram esterilizados previamente e todos os procedimentos experimentais realizados dentro de câmara de fluxo laminar (marca).

Os espécimes foram divididos em 5 grupos (n=10), onde 4 grupos receberam irrigação ultrassônica passiva e 1 grupo recebeu irrigação convencional. Um espécime de cada grupo não foi submetido ao tratamento, sendo o controle positivo para o crescimento intratubular bacteriano.

Pela conicidade e diâmetro do canal influenciar na eficácia da irrigação ultrassônica na remoção de detritos, determinou-se o instrumento empregado (10). Os canais foram preparados com um instrumento X1 – Blue (40.06) (MK LIFE, Medical and Products, Brasil), acionado por um motor elétrico X-Smart Plus (Dentsply, Maillefer) em cinemática reciprocante. Foi realizada a instrumentação por terços (cervical, médio e apical), totalizando 3 inserções, até o comprimento de trabalho. Após seu uso em cada 1/3, o instrumento foi limpo com uma gaze esterilizada.

O irrigante foi água destilada esterilizada, solução inerte que não causa efeitos falso-positivos na descontaminação bacteriana. Os canais foram irrigados com 5mL de solução antes da inserção do instrumento e após a inserção em cada um dos terços do canal radicular (cervical, médio e apical), totalizando 3 inserções e

20 mL de solução irrigante (4). A irrigação foi realizada com uma seringa descartável de 5 mL e ponta de irrigação 29Ga (NaviTips; Ultradent, South Jordan, UT, EUA).

Para todas as agitações ultrassônicas utilizou-se a unidade ultrassônica P5 Newtron (Acteon North America) (12) na potência 4 com inserto ultrassônico E1 Irrisonic (Helse Ultrassonic), com ponta 0,2mm e taper 0,01.(17). O inserto ultrassônico foi movido no sentido do achatamento.

Grupo IC (Irrigação convencional): Não recebeu irrigação ultrassônica.

Grupo PUIC (PUI no terço cervical): Realizada nos 4mm iniciais após a instrumentação do terço cervical, por 3 ciclos de 20 segundos e renovação de 5mL a cada ciclo, totalizando 15 mL de irrigante dispensado.

Grupo PUIA (PUI no terço apical): Realizada 2mm aquém do comprimento de trabalho após a instrumentação completa da raiz, por 3 ciclos de 20 segundos e renovação de 5mL a cada ciclo, totalizando 15 mL de irrigante dispensado.

Grupo PUICA (PUI no terço cervical e apical): Dentes na posição inferior. PUI realizada no 1/3 cervical após sua instrumentação e posteriormente 2mm aquém do comprimento de trabalho após a instrumentação completa da raiz, ambos momentos por 3 ciclos de 20 segundos e renovação de 5mL a cada ciclo, totalizando 30 mL de irrigante dispensado.

Grupo PUICAS (PUI no terço cervical e apical): Dentes na posição superior. PUI realizada no 1/3 cervical após sua instrumentação e posteriormente 2mm aquém do comprimento de trabalho após a instrumentação completa da raiz, ambos momentos por 3 ciclos de 20 segundos e renovação de 5mL a cada ciclo, totalizando 30 mL de irrigante dispensado.

Em PUICAS, os dentes foram fixados em um aparato que simula a arcada dentária na posição de incisivo central superior, de acordo com a figura 1.

Figura 1 Aparato desenvolvido para posicionar o dente em estudo em uma posição de arco superior, com dente posicionado na angulação de 110°. Todo o aparato foi esterilizado e a cera pegajosa manipulada junto à chama e dentro de câmara de fluxo laminar.

Figura 2 – Distribuição dos grupos experimentais

Análise volumétrica em micro-CT de detritos dentinários extruídos

Os espécimes foram digitalizados em um micro-CT (SkyScan 1174.v2; Bruker-microCT, Kontich, Bélgica) a 50 Kv, 800 mA, uma resolução isotrópica de 17 μm , 180° ao redor do eixo vertical. Após a digitalização, as imagens foram reconstruídas usando o software NRecon v.1.6.9 (Bruker-microCT). Em seguida, a

análise quantitativa tridimensional do volume de detritos extruídos foi realizada usando o software CTAn v1.5.4.0 (Bruker-microCT). O operador foi cegado durante a varredura e análise (20).

Avaliação da quantidade de UFC/mL extruídos

O microtubo contendo o gel de agarose foi aberto e em condições assépticas realizadas coletas do conteúdo extruído. A coleta foi feita dispensando 50 microlitros de água destilada esterilizada sobre o gel de agarose solidificado, homogeneizando com a pipeta (marca). A partir deste conteúdo realizaram-se diluições em microtubos contendo BHI, semeadura em placas de ágar BHI, incubação a 37°C durante 48 horas e contagem das unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) de *Enterococcus faecalis*. O valor obtido foi convertido em Log 10, conforme descrito anteriormente por Vasconcelos et al (22).

Avaliação da viabilidade bacteriana intradentinária pela microscopia confocal de varredura a laser (MCVL)

Os espécimes foram seccionados longitudinalmente usando uma máquina de corte Isomet (Isomet, Buehler, Lake Bluff, Illinois, EUA) com um disco de diamante, resfriado com solução salina esterilizada. A camada de esfregaço produzida por este corte foi removida com 2,5 mL de EDTA a 17% por 3 min e os espécimes foram lavados com solução salina esterilizada. Os espécimes foram corados com 30 µL de corante de viabilidade bacteriana LIVE/ DEAD® Bac Light™ (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA) por 20 minutos. Este kit contém o corante SYTO 9®, que marca as bactérias vivas com um pigmento verde, e corante iodeto de propídio, que marca as mortas com um pigmento vermelho, permitindo assim que bactérias viáveis sejam facilmente identificadas. Os espécimes foram examinados com um microscópio confocal de varredura a laser Leica TCS-SPE invertido (Leica Microsystems GmbH, Mannheim, Baden-Württemberg, Alemanha) usando uma lente de ampliação de 40X, com óleo de imersão. As imagens foram obtidas com tamanho de passo de 1 µm, até aproximadamente 15 µm de profundidade (3D), no formato de 1024 × 1024 pixels. Para uma análise objetiva, as imagens de MCVL foram convertidas no

formato "tiff" pelo software LAS AF e analisadas com o software bioImageL *TM* v2 (22).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

A ausência de normalidade entre os grupos foi observada pelo teste de Shapiro-Wilk, assim utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis seguido de Dunn para comparação entre os grupos. Utilizou-se o software Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, EUA) como ferramenta analítica, e o nível de significância foi estabelecido em 5%.

RESULTADOS

Avaliação volumétrica da extrusão

Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos na avaliação do volume de extrusão de detritos ($P > 0,05$). (Tabela 1). Na Figura 3 observa-se uma imagem representativa de extrusão de detritos detectada por micro-CT.

Avaliação da cultura microbiológica

Os dados quantitativos das bactérias extruídas em cada grupo são mostradas na tabela 2. Houve similaridade, sem diferença estatística entre os grupos IC, PUIC e PUIA. Os grupos PUICA e PUICAS apresentaram maior extrusão bacteriana periapical em UFC/mL mostrando diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$).

Análise microbiológica de microscopia confocal de varredura a laser (MCVL)

A análise da microscopia confocal de varredura a laser revelou que *E. faecalis* conseguiu colonizar as paredes do canal radicular das amostras controle, formando estruturas densas de biofilme. A análise inter-grupos mostrou que de acordo com a viabilidade bacteriana detectada nas imagens, os grupos IC e PUIC apresentaram maior porcentagem de bactérias vivas, com diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$) em relação aos demais grupos. Não houve diferença estatística na redução bacteriana intratubular entre os PUIA, PUICA e PUICAS. Houve diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) entre cada grupo e o controle positivo (Tabela 3). Na Figura 4 se observam imagens obtidas em MCVL, demonstrando bactérias nos túbulos dentinários dos diferentes grupos, coradas em verde (viáveis) ou em vermelho (bactérias mortas).

Tabela 1- Média, mediana, mínimo e máximo do volume de detritos extruídos, após o uso dos diferentes protocolos, analisadas através do micro-CT

GRUPOS	MÉDIA	MEDIANA (min– max)
IC	0 (0)	0
PUIC	0 (0)	0
PUIA	0,10 (0,03)	0 (0 – 0,59) ^a
PUICA	0,07 (0,02)	0 (0 – 0,25) ^a
PUICAS	0,07 (0,02)	0 (0-0,71) ^a

* Letras diferentes determinam diferença significante entre os grupos, pelo teste de Kruskal-Wallis seguido de Dunn.

Figura 3: Imagem representativa de espécime demonstrando o detrito dentinário extruído via forame apical

Tabela 2- Mediana, contagem bacteriana mínima e máxima da avaliação da cultura microbiológica extruída apicalmente (UFC/mL), média e desvio padrão, em cada grupo experimental. O valor de *P* e o intervalo de confiança de 95% dos dados log de 10^6 UFC/mL entre os grupos experimentais.

GRUPOS	MÉDIA Log 10 INICIAL	MÉDIA Log 10 EXTRUSÃO	% EXTRUSÃO (min– max)
IC	6,76	5,58	83,46 (77,03 - 86,80) ^a
PUIC	6,83	6,32	79,89 (0 - 89,64) ^a
PUIA	6,86	6,16	90,27 (74,87 - 96,84) ^{a,b}
PUICA	6,76	6,09	90,96 (78,27 - 95,23) ^b
PUICAS	6,83	6,37	93,16 (89,41-100) ^b

* Letras diferentes determinam diferença significativa entre os grupos, pelo teste de Kruskal-Wallis seguido de Dunn.

Tabela 3: Viabilidade bacteriana: Análise de Kruskal-wallis, seguido de Dunn a partir da análise de variância unidirecional mostra a diferença de mediana, valores máximos e mínimos, média e desvio padrão de bactérias vivas

GRUPOS	MÉDIA (D.P.)	MEDIANA (min– max)
C+	76,66 (30,92)	95,81 (3,21 – 100) ^a
IC	51,59 (34,27)	49,02 (2,21 – 98,12) ^b
PUIC	39,22 (31,11)	33,01 (2,04 – 100) ^b
PUIA	37,95 (36,93)	20,76 (1,23 – 100) ^{b,c}
PUIAC	28,86 (34,49)	7,48 (0,01 – 98,53) ^c
PUIACS	25,18 (30,70)	12,96 (0 – 97,61) ^c

* Letras diferentes determinam diferença significativa entre os grupos, pelo teste de Kruskal-Wallis seguido de Dunn.

Figura 4: Imagens dos túbulos dentinários obtida por microscopia confocal de varredura a laser após os protocolos instituídos. **C+**: Grupo Controle Positivo; **IC**: Irrigação Convencional; **PUIC**: PUI na cervical, **PUIA**: PUI na apical, **PUICA**: PUI na cervical e apical (dente em posição inferior), **PUICAS**: PUI na cervical e apical (dente em posição superior).

DISCUSSÃO

A manutenção dos microrganismos no sistema de canais radiculares é a principal causa de falha pós-tratamento endodôntico. Dentre as bactérias encontradas nestes casos, *E. faecalis* tem sido frequentemente isolada da dentina radicular infectada (1,4). Portanto, é necessário eliminar esses microrganismos organizados em forma de biofilme do SCR infectados, tanto quanto possível, durante o preparo químico-mecânico (1).

Embora normalmente não seja recomendada como a solução principal durante o preparo, no presente estudo, a água destilada esterilizada foi o irrigante de escolha por ser uma solução inerte que não causa efeitos falso-positivos na descontaminação bacteriana (20,21). O objetivo no presente estudo foi verificar a influência físico-mecânica das técnicas ultrassônicas adjuvantes somente, sem a influência do irrigante (22) e além do mais, os artigos que avaliam extrusão também usam solução inerte, para não interferir nos resultados (24,25,26).

Quatro diferentes protocolos de uso da irrigação ultrassônica passiva foram testados em busca de uma maior desinfecção intratubular e menor extrusão periapical de bactérias. O protocolo usualmente empregado no uso da PUI é o apresentado por PUIA, onde a irrigação ultrassônica da solução é realizada ao final do preparo químico-mecânico (13). O presente estudo considerou de fundamental importância incluir este protocolo, uma vez que serve de referência a várias linhas de pesquisa (13,14).

Os resultados revelaram que a contaminação bacteriana intratubular foi substancialmente reduzida pelos efeitos mecânicos produzidos nos protocolos de PUICA e PUICAS, onde a irrigação ultrassônica da solução foi realizada em dois momentos distintos. Momentos distintos da agitação, somado ao tempo final de uso do ultrassom promoveu significativamente maior descontaminação intratubular quando comparados aos grupos C+, IC e PUIC. Embora os resultados demonstrem não haver diferenças estatisticamente significantes entre PUIA, PUI no terço apical, e PUICA e PUICAS, PUI em dois momentos, há uma tendência de maior descontaminação quando a irrigação ultrassônica foi empregada em dois momentos.

Não houve diferença estatística quando o mesmo protocolo ultrassônico foi empregado em dentes na posição superior (PUICAS) e inferior (PUICA), sugerindo que a posição do mesmo grupo dental na arcada dentária, não é mandatória na descontaminação intratubular.

O uso da irrigação convencional na redução bacteriana intratubular mostrou o pior desempenho entre os grupos testados, indo de encontro com achados na literatura (21), exceto quando comparado ao PUIC, onde a irrigação ultrassônica da solução foi realizada apenas na terço cervical, refutando parcialmente a hipótese nula. Apesar de não estatisticamente significante, PUIC, também demonstrou desempenho inferior quando comparada a PUIA, sugerindo que ativação ultrassônica do irrigante apenas na terço apical seja mais relevante do que a realizada apenas no terço cervical.

Estudos mostram que a extrusão periapical de detritos e soluções irrigantes podem ser as principais causas de exacerbação inflamatória, corroborando no atraso da cicatrização dos tecidos periapicais (6,11). O protocolo da PUI apenas no terço cervical (PUICA) foi proposto visando diminuir a extrusão periapical de bactérias, desta forma, reduzindo possíveis danos a essa região.

Os achados deste estudo demonstraram não haver diferenças estatisticamente significantes entre os protocolos de uso da PUI, em PUIC e PUIA, quanto à extrusão de *E. faecalis* para a região periapical. Apenas os grupos PUICA e PUICAS, onde a irrigação ultrassônica foi empregada em dois momentos, mostraram lançar significativamente mais bactérias para o periápice quando comparado aos demais grupos (23).

Estes resultados podem ser justificados devido ao maior tempo de uso da irrigação ultrassônica em PUICA e PUICAS, onde a PUI realizada em dois momentos desprende maior quantidade de detritos da luz do canal radicular, onde estão contidas grandes quantidade de bactérias, o que pode ter corroborado para uma maior extrusão periapical. Espera-se que isso, no entanto, não prejudique os benefícios potenciais do emprego da PUI em dois momentos, visto que nas

condições clínicas o uso de irrigantes antibacterianos cause a morte da maioria das bactérias extruídas (1,10).

Sob a análise volumétrica em micro-CT, de acordo com os resultados obtidos neste estudo, a quantidade detectada de detritos extruídos apicalmente é bastante pequena, independente do protocolo de escolha proposto para a agitação ultrassônica, não havendo diferenças estatísticas entre os grupos.

Embora sem diferenças estatísticas, observou-se que o grupo PUIC, onde a PUI foi utilizada apenas no terço cervical, extruiu 4 vezes menos que o grupo PUIA, onde a PUI foi utilizada no terço apical. O mesmo resultado não ocorre quando se faz a análise por cultura microbiológica do mesmo material extruído.

Nos grupos PUICA e PUICAS, onde houve mais agitação ultrassônica, também foi observada , maior extrusão microbiana. Assim, estudos clínicos randomizados devem ser realizados para avaliar se a extrusão ocorrida, frente aos protocolos de uso da PUI, pode comprometer o processo de reparo em dentes necróticos com reações periapicais.

CONCLUSÃO

Todos os protocolos de irrigação foram associados à extrusão bacteriana periapical. Os protocolos onde se utilizou a PUI em dois momentos tiveram significativa redução na carga bacteriana intratubular, o que é o objetivo do tratamento endodôntico, porém, houve maior extrusão bacteriana periapical, o que sugere a necessidade de maiores estudos quanto ao comportamento biológico dos tecidos periapicais frente a essa extrusão.

REFERÊNCIAS

1. Zeng C, Willison J, Meghil MM, Bergeron BE, Cutler CW, Tay FR, Niu L, Ma J. Antibacterial efficacy of an endodontic sonic-powered irrigation system: An in vitro study. *J Dent*. 2018 Aug;75:105-112.
 2. de Brito LC, Teles FR, Teles RP, Nogueira PM, Vieira LQ, Ribeiro Sobrinho AP. Immunological profile of periapical endodontic infections from HIV- and HIV+ patients. *Int Endod J*. 2015 Jun;48(6):533-41.
 3. Herrera DR, Martinho FC, de-Jesus-Soares A, Zaia AA, Ferraz CCR, Almeida JFA, Gomes BPFA. Clinical efficacy of EDTA ultrasonic activation in the reduction of endotoxins and cultivable bacteria. *Int Endod J*. 2017 Oct;50(10):933-940.
 4. Pladisai P, Ampornaramveth RS, Chivatxaranukul P. Effectiveness of Different Disinfection Protocols on the Reduction of Bacteria in *Enterococcus faecalis* Biofilm in Teeth with Large Root Canals. *J Endod* 2016;42(3):460-4.
 5. Orozco EIF, Toia CC, Cavalli D, Khoury RD, Cardoso FGDR, Bresciani E, Valera MC. Effect of passive ultrasonic activation on microorganisms in primary root canal infection: a randomized clinical trial. *J Appl Oral Sci* 2019;28:e20190100
 6. Alturaiki S, Lamphon H, Edrees H, Ahlquist M. Efficacy of 3 different irrigation systems on removal of calcium hydroxide from the root canal: a scanning electron microscopic study. *J Endod* 2015;41(1):97-101.
 7. Castelo-Baz PC, Martín-Biedma B, Cantatore G, Ruíz-Piñón M, Bahillo J, Rivas-Mundiña B, Varela-Patiño P. In vitro comparison of passive and continuous ultrasonic irrigation in simulated lateral canals of extracted teeth. *J Endod* 2012;38(5):688-91.
-

8. Karatas E, Ozsu D, Arslan H, Erdogan AS. Comparison of the effect of nonactivated self-adjusting file system, Vibringe, EndoVac, ultrasonic and needle irrigation on apical extrusion of debris. *Int Endod J* 2015;48(4):317-22.
 9. Karade P, Chopade R, Patil S, Hoshing U, Rao M, Rane N, Chopade A, Kulkarni A. Efficiency of Different Endodontic Irrigation and Activation Systems in Removal of the Smear Layer: A Scanning Electron Microscopy Study. *Iran Endod J* 2017;12(4):414-418.
 10. Borges AH, Pereira TM, Porto AN, Estrela CRA, Miranda FLP, Aranha AM, Guedes OA. The Influence of Cervical Preflaring on the Amount of Apically Extruded Debris after Root Canal Preparation Using Different Instrumentation Systems. *J Endod* 2016;42(3):465-9.
 11. Romualdo PC, de Oliveira KMH, Nemezio MA, Kuchler EC, Silva RAB, Nelson-Filho P, Silva LAB. Does apical negative pressure prevent the apical extrusion of debris and irrigant compared with conventional irrigation? A systematic review and meta- analysis. *Aust Endod J* 2017;43(3):129-137.
 12. Sasanakul P, Ampornaramveth RS, Chivatxaranukul P. Influence of Adjuncts to Irrigation in the Disinfection of Large Root Canals. *J Endod*. 2019 Mar;45(3):332-337.
 13. Varela P, Souza E, de Deus G, Duran-Sindreu F, Mercadé M. Effectiveness of complementary irrigation routines in debriding pulp tissue from root canals instrumented with a single reciprocating file. *Int Endod J*. 2019 Apr;52(4):475-483.
 14. Nakamura VC, Pinheiro ET, Prado LC, Silveira AC, Carvalho APL, Mayer MPA, Gavini G. Effect of ultrasonic activation on the reduction of bacteria and endotoxins in root canals: a randomized clinical trial. *Int Endod J*. 2018 Jan;51 Suppl 1:e12-e22.
-

15. Leoni GB, Versiani MA, Pécora JD, Damião de Sousa-Neto M. Micro-computed tomographic analysis of the root canal morphology of mandibular incisors. *J Endod* 2014;40(5):710-6.
 16. Versiani MA, Alves FR, Andrade-Junior CV, Marceliano-Alves MF, Provenzano JC, Rôças IN, Sousa-Neto MD, Siqueira JF Jr. Micro-CT evaluation of the efficacy of hard-tissue removal from the root canal and isthmus area by positive and negative pressure irrigation systems. *Int Endod J* 2016;49(11):1079-1087.
 17. Machado ME, Nabeshima CK, Leonardo MF, Reis FA, Britto ML, Cai S. Influence of reciprocating single-file and rotary instrumentation on bacterial reduction on infected root canals. *Int Endod J* 2013;46(11):1083-7.
 18. Andrade FB, Arias MP, Maliza AG, Duarte MA, Graeff MS, Amoroso-Silva PA, Midena RZ, Moraes IG. A new improved protocol for in vitro intratubular dentinal bacterial contamination for antimicrobial endodontic tests: standardization and validation by confocal laser scanning microscopy. *J Appl Oral Sci* 2015;23(6):591-8.
 19. Ma J, Wang Z, Shen Y, Haapasalo M. A new noninvasive model to study the effectiveness of dentin disinfection by using confocal laser scanning microscopy. *J Endod* 2011;37(10):1380-5.
 20. Alves FRF, Paiva PL, Marceliano-Alves MF, Cabreira LJ, Lima KC, Siqueira JF Jr, Rôças IN, Provenzano JC. Bacteria and Hard Tissue Debris Extrusion and Intracanal Bacterial Reduction Promoted by XP-endo Shaper and Reciproc Instruments. *J Endod* 2018;44(7):1173-1178.
 21. Latham J, Fong H, Jewett A, Johnson JD, Paranjpe A. Disinfection Efficacy of Current Regenerative Endodontic Protocols in Simulated Necrotic Immature Permanent Teeth. *J Endod* 2016;42(8):1218-25.
 22. Vasconcelos LRSM, Midena RZ, Minotti PG, Pereira TC, Duarte MAH, Andrade
-

- FB. Effect of ultrasound streaming on the disinfection of flattened root canals prepared by rotary and reciprocating systems. *J Appl Oral Sci* 2017;25(5):477-482.
23. Van der Sluis LW, Versluis M, Wu MK, Wesselink PR. Passive ultrasonic irrigation of the root canal: a review of the literature. *Int Endod J* 2007;40(6):415-26
24. Capar ID, Arslan H, Akcay M, et al . An in vitro comparison of apically extruded debris and instrumentation times with ProTaper Universal, ProTaper Next, Twisted File Adaptive, and HyFlex instruments. *J Endod*. 2014;40(10):1638-41.
25. De-Deus G, Marins J, Silva EJ, et al. Accumulated hard tissue debris produced during reciprocating and rotary nickel-titanium canal preparation. *J Endod*. 2015;41(5):676-81
26. Kirchhoff AL, Fariniuk LF, Mello I. Apical Extrusion of Debris in Flat-oval Root Canals after Using Different Instrumentation Systems. *J Endod*. 2015;41(2):237-41.
-
-

3 DISCUSSÃO

3 DISCUSSÃO

A relevância clínica e biológica da extrusão apical durante a terapia endodôntica é apoiada pela literatura, que mostra que não só os microrganismos, mas também soluções irrigadoras e detritos podem ser lançados ao periápice, causando lesões nos tecidos circunjacentes e iniciar uma inflamação aguda³⁹. Esta resposta biológica pode se manifestar como uma dor pós-operatória e/ou tumefação, causando desconforto aos pacientes. Além disso, os microrganismos extruídos apicalmente podem ser uma fonte de infecção extrarradicular, comprometendo o resultado do tratamento endodôntico²⁹.

A manutenção dos microrganismos no sistema de canais radiculares é a principal causa de falha pós-tratamento endodôntico. Dentre as bactérias encontradas nestes casos, *E. faecalis* tem sido frequentemente isolada da dentina radicular infectada^{27,50}. É necessário, portanto, que esses microrganismos organizados em forma de biofilme sejam eliminados, tanto quanto possível, durante o preparo químico-mecânico⁵⁰. Até o presente momento, não foi determinado clinicamente a quantidade e a frequência da extrusão apical de detritos para a região periapical em conjunto com a descontaminação intratubular.

A prevalência de *Enterococcus faecalis*, espécie de bactéria anaeróbia facultativa, nos dentes com periodontite apical persistente pode ser atribuído à sua alta tolerância a irrigantes e medicamentos intracanal, capacidade de prosperar em pH alcalino e suportar privações nutricionais, capacidade de invadir túbulos dentinários e aderir ao colágeno desmineralizado de dentina, além de conseguir penetrar até 1.000 µm nos túbulos dentinários³⁷. Portanto, *E. faecalis* foi escolhido para a infecção intratubular do presente estudo.

A escolha do protocolo de contaminação dos dentes, nesta pesquisa, foi baseada na metodologia proposta por Andrade et al.³, a qual proporciona uma alta proliferação bacteriana e contaminação homogênea dos túbulos dentinários. Esses aspectos são essenciais para estudos antimicrobianos de infecções endodônticas utilizando modelos *in vitro*, uma vez que produzem resultados mais precisos e evitam falsos negativos. Para garantir a eficácia desta contaminação, em todos os

grupos do presente trabalho, um espécime de cada grupo foi utilizado como controle positivo através da microscopia confocal de varredura à laser⁴, garantindo a contaminação satisfatória dos espécimes.

Diversas técnicas e dispositivos de irrigação vêm sendo utilizados com o objetivo de melhorar a irrigação final antes da obturação. A ativação da solução de escolha no SCR pode aumentar a dispersão do irrigante²⁶ e melhorar a limpeza mecânica do canal radicular pela dinâmica efetiva do fluxo de fluidos¹⁸. Considerando que, de acordo com a literatura específica, os sistemas de irrigação ultrassônica passiva (PUI) e contínua (CUI) apresentam resultados promissores^{7,17}, neste estudo utilizaram-se estes dois sistemas para a entrega do irrigante. No entanto, até onde se sabe, nenhum estudo investigou a PUI e a CUI em diferentes momentos, variando seu volume de solução e tempo de uso.

O presente estudo comparou a eficácia da irrigação ultrassônica passiva (PUI) e da irrigação ultrassônica contínua (CUI) em diferentes momentos e protocolos de uso em dentes contaminados com *Enterococcus faecalis*. Todas as propostas de uso da PUI e da CUI apresentadas pela literatura, empregam-nas como protocolo de irrigação final^{7,43}.

Visto que o tamanho do preparo do canal radicular pode influenciar a eficácia dos protocolos de irrigação⁴¹ os dentes unirradiculados foram preparados com um instrumento de ponta 40 e conicidade 0,6. Este diâmetro apical é clinicamente relevante e permite uma irrigação eficaz com dilatação suficiente para impedir o toque do inserto ultrassônico nas paredes do canal radicular durante a irrigação ultrassônica, além de permitir um adequado refluxo da solução^{19,35}. Todos os espécimes selecionados passaram por escaneamento prévio em micro-CT, onde foi mensurado o volume inicial dos canais e distribuídos de forma equivalente entre os grupos, permitindo a homogeneidade entre os grupos e gerando uma amostragem padronizada².

A água destilada foi utilizada como solução irrigante por ser uma solução inerte, uma vez que o objetivo foi avaliar a capacidade de descontaminação intratubular e extrusão periapical de detritos de forma mecânica. O emprego de uma solução com efeito antimicrobiano, como o hipoclorito de sódio, poderia ter causado

resultados falso-positivos de eliminação bacteriana, impedindo a detecção e diferenciação do comportamento dos grupos de estudo². Outros trabalhos também avaliaram microbiologicamente a extrusão, utilizando irrigante inerte^{6,12,22,33,34}.

A pressão apical negativa em alguns trabalhos é sugerida como opção de aspiração, com o intuito de evitar extrusões. Esta simulação mostrou bons resultados na diminuição do volume do irrigante lançado via forame³¹, porém não há garantia de diminuição da extrusão de detritos. Trabalhos metodológicos avaliando essas variações são sugeridos para estudos futuros. A aspiração do irrigante foi empregada simulando uma situação clínica, com o intuito de diminuir o excesso de detritos dentro do canal radicular⁴⁵.

Para simular a situação clínica, utilizamos um desenho de canal fechado *in vitro* que replica de perto o cenário *in vivo*⁴⁶ em que o forame apical é envolvido pelos tecidos periodontais². Para simular os tecidos periodontais, utilizou-se o gel de agarose, transparente o suficiente para não prejudicar a leitura do volume de debris por meio do micro-CT. Esse método força os irrigantes a sair do canal por via coronária, em vez de apical ou lateralmente².

Quando o fator limpeza intratubular foi avaliado, a utilização da irrigação ultrassônica é bastante recomendada^{36,47}. Os resultados da análise comparativa da descontaminação intratubular observada nos diferentes grupos avaliados, revelou que os protocolos onde a irrigação ultrassônica foi utilizada em dois momentos diferentes, em conjunto com o maior tempo de uso, mostraram redução relevante da contaminação intratubular bacteriana e foram significativamente mais eficazes do que o grupo utilizando apenas a irrigação convencional (grupo controle). Estes achados confirmam o importante papel da irrigação ultrassônica na redução bacteriana intratubular^{36,47}.

Nossos resultados estão alinhados com os de estudos anteriores, demonstrando que o emprego da agitação ultrassônica melhora efetivamente a remoção bacteriana do canal radicular em diferentes magnitudes^{7,44}. O emprego da irrigação ultrassônica permite que o inserto vibre o irrigante, aumentando seu potencial de contato com uma grande área superficial, o que gera desorganização

do biofilme bacteriano ao longo da parede do canal radicular, ocasionando a eliminação de bactérias^{32,44}.

Na avaliação da extrusão bacteriana periapical verificada através de contagem de UFCs/mL, o artigo 1 demonstrou não haver diferenças estatisticamente significantes entre os protocolos de uso da CUI e da PUI. Apenas alguns protocolos de uso da CUI lançaram significativamente mais bactérias (UFC/mL) para o periápice, quando comparado ao grupo controle, onde não foi empregada irrigação ultrassônica em nenhum momento. Esse achado pode ser devido à troca contínua de solução fornecida pela técnica CUI e a ativação otimizada da solução à medida que ela passa pelo inserto com energia ultrassônica. Essa força pode comprometer a segurança do procedimento de limpeza devido às graves consequências se o irrigante de escolha for o hipoclorito de sódio e o mesmo for extruído para os tecidos periapicais.

Já no artigo 2, em que diferentes protocolos utilizando-se apenas a PUI foram propostos, apenas os grupos os quais utilizaram a irrigação ultrassônica em dois momentos mostraram lançar significativamente mais bactérias (UFC/mL) para o periápice. Este resultado se deve possivelmente ao maior tempo de uso da PUI empregada em dois momentos, onde foi possível desprender maior quantidade bacteriana da luz do canal radicular, o que pode ter contribuído para uma maior extrusão periapical.

Deve-se considerar então a capacidade da PUI e da CUI em eliminar biofilme bacteriano da luz do canal radicular e eliminar bactérias dos túbulos dentinários, porém uma possível quantidade de detritos produzida durante a ação destes insertos ultrassônicos é despreendida e lançada para a região periapical em maior ou menor grau dependendo do protocolo de uso estabelecido. A dúvida é até quanto isso é relevante clinicamente, causando sintomatologia dolorosa e até mesmo respostas agudas.

Sob a análise em micro-CT, de acordo com os resultados obtidos neste estudo, a quantidade de detritos extruídos apicalmente detectada é bastante pequena, independente do protocolo de escolha proposto para a agitação ultrassônica. Não houve diferença estatística entre o volume de detritos extruídos

dos grupos em nenhum dos dois trabalhos. É preciso enfatizar que os resultados não devem ser generalizados para dentes com desenvolvimento radicular imaturo e ápice aberto.

Além disso, não foi observada correlação entre o volume de detritos extruídos e a contagem de bactérias (UFC/mL) extruídas, indo de acordo com os achados de trabalho anterior². Sugere-se que detritos podem ser compactados em irregularidades do canal radicular, o que limita a extrusão apical²⁴. É possível também que a falta de sensibilidade da análise por micro-CT cause limitação do método, pois restos de tecido duro dissolvidos na solução irrigante podem passar despercebidos pela resolução usada na varredura por micro-CT², no entanto, as bactérias estão sendo lançadas para a região periapical, em maior ou menor grau.

4 CONCLUSÃO

4 CONCLUSÃO

A irrigação ultrassônica passiva e contínua mostraram-se superiores na descontaminação intratubular em relação à irrigação convencional, havendo uma melhora da descontaminação quando o emprego da PUI e CUI foi realizado por mais vezes e por mais tempo.

Em relação à extrusão bacteriana periapical, todos os grupos propostos apresentaram extrusões equivalentes, permitindo assim afirmar que a irrigação causa extrusão bacteriana em maior ou menor grau, independente da técnica empregada, sem diferenças significantes, quando do uso de um veículo inerte.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

1. Aksel H, Küçükkaya Eren S, Çakar A, Serper A, Özkuyumcu C, Azim AA. Effect of Instrumentation Techniques and Preparation Taper on Apical Extrusion of Bacteria. *J Endod*. 2017;43(6):1008-10.
 2. Alves FRF, Paiva PL, Marceliano-Alves MF, Cabreira LJ, Lima KC, Siqueira JF Jr, Rôças IN, Provenzano JC. Bacteria and Hard Tissue Debris Extrusion and Intracanal Bacterial Reduction Promoted by XP-endo Shaper and Reciproc Instruments. *J Endod*. 2018;44(7):1173-8.
 3. Andrade FB, Arias MP, Maliza AG, Duarte MA, Graeff MS, Amoroso-Silva PA, Midená RZ, Moraes IG. A new improved protocol for in vitro intratubular dentinal bacterial contamination for antimicrobial endodontic tests: standardization and validation by confocal laser scanning microscopy. *J Appl Oral Sci*. 2015;23(6):591-8.
 4. Arias MP, Maliza AG, Midená RZ, Graeff MS, Duarte MA, Andrade FB. Effect of ultrasonic streaming on intra-dentinal disinfection and penetration of calcium hydroxide paste in endodontic treatment. *J Appl Oral Sci*. 2016;24(6):575-81.
 5. Borges AH, Pereira TM, Porto AN, Estrela CRA, Miranda FLP, Aranha AM, Guedes OA. The Influence of Cervical Preflaring on the Amount of Apically Extruded Debris after Root Canal Preparation Using Different Instrumentation Systems. *J Endod*. 2016;42(3):465-9.
 6. Capar ID, Arslan H, Akcay M, et al . An in vitro comparison of apically extruded debris and instrumentation times with ProTaper Universal, ProTaper Next, Twisted File Adaptive, and HyFlex instruments. *J Endod*. 2014;40(10):1638-41.
 7. Castelo-Baz P, Varela-Patiño P, Cantatore G, et al. In vitro comparison of passive and continuous ultrasonic irrigation in curved root canals. *J Clin Exp Dent*. 2016;8(4):437–41.
 8. Castelo-Baz PC, Martín-Biedma B, Cantatore G, Ruíz-Piñón M, Bahillo J, Rivas-Mundiña B, Varela-Patiño P. In vitro comparison of passive and continuous ultrasonic irrigation in simulated lateral canals of extracted teeth. *J Endod*. 2012;38(5):688-91.
 9. Dametto FR. et al. In vitro assessment of the immediate and prolonged antimicrobial action of chlorhexidine gem as na endodontic irrigant against *Enterococcus faecalis*. *Oral Surg Oral Med Oral Oral Radiol Endod*.
-

2005;99(6):768-72.

10. Dannemann M, Kucher M, Kirsch J, et al. An Approach for a Mathematical Description of Human Root Canals by Means of Elementary Parameters. *J Endod.* 2017;43(4):536-43.
 11. De Oliveira RL. et al. Computed microtomography evaluation of calcium hydroxide-based root canal dressing from oval root canals by diferente methods of irrigation. *Microsc Res Tech.* 2019;82(3): 232-7.
 12. De-Deus G, Marins J, Silva EJ, et al. Accumulated hard tissue debris produced during reciprocating and rotary nickel-titanium canal preparation. *J Endod.* 2015;41(5):676-81
 13. Del Carpio-Perochena AE. et al. Effect of temperature, concentration and time of sodium hypochlorite on the treatment and revitalization of oral biofilms. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects.* 2015;9(4):209-15.
 14. Duque JA. et al. Comparative effectiveness of new mechanical irrigant agitating devices for debris removal from the canal and isthmus of mesial roots of mandibular molars. *J Endod.* 2017;43(2): 326-31.
 15. Goldberg F, Abramovich A. Analysis of the effect of EDTAC on the dentinal walls of the root canal. *J Endod.* 1977; 3(3):102-5.
 16. Gupta J, Nikhil V, Jha P. Corelation between machines assisted endodontic irrigant agitation and apical extrusion of debris and irrigant: a laboratory study. *Scientific World Journal.* 2014;34(6)18-24.
 17. Jamleh A, Suda H, Adorno CG. Irrigation effectiveness of continuous ultrasonic irrigation system: An ex vivo study. *Dent Mater J.* 2018;37(1):1–5.
 18. Jiang LM, Verhaagen B, Versluis M, Van der Sluis LW. Evaluation of a sonic device designed to activate irrigant in the root canal. *J Endod.* 2010;36(1):143-6.
 19. K. W. Falk, C. M. Sedgley. The influence of preparation size on the mechanical efficacy of root canal irrigation in vitro. *J Endod.* 2005.31(1);742–5.
 20. Karade P, Chopade R, Patil S, et al. Efficiency of Different Endodontic Irrigation and Activation Systems in Removal of the Smear Layer: A Scanning Electron Microscopy Study. *Iran Endod J.* 2017;12(4):414-8.
-

21. Karatas E, Ozsu D, Arslan H, Erdogan AS. Comparison of the effect of nonactivated self-adjusting file system, Vibringe, EndoVac, ultrasonic and needle irrigation on apical extrusion of debris. *Int Endod J*. 2015;48(4):317-22.
 22. Kirchhoff AL, Fariniuk LF, Mello I. Apical Extrusion of Debris in Flat-oval Root Canals after Using Different Instrumentation Systems. *J Endod*. 2015;41(2):237-41.
 23. Kuştarci A, Akpınar KE, Sümer Z, Er K, Bek B. Apical extrusion of intracanal bacteria following use of various instrumentation techniques. *Int Endod J*. 2008;41(12):1066-71.
 24. Leoni GB, Versiani MA, Pécora JD, Damião de Sousa-Neto M. Micro-computed tomographic analysis of the root canal morphology of mandibular incisors. *J Endod*. 2015;40(5):710-6.
 25. Malhotra C. et al. In vivo confocal microscopic characteristics of microsporidial keratoconjunctivitis in immunocompetent adults. *Br J Ophthalmol*. 2017;101(9):1217-22.
 26. Moorer WR, Wesselink PR. Factors promoting the tissue dissolving capability of sodium hypochlorite. *Int Endod J*. 1982;15(4):187–96.
 27. Pladisai P, Ampornaramveth RS, Chivatxaranukul P. Effectiveness of Different Disinfection Protocols on the Reduction of Bacteria in *Enterococcus faecalis* Biofilm in Teeth with Large Root Canals. *J Endod*. 2016;42(3):460–64.
 28. Ricucci D, Loghin S, Gonçalves LS, Rôças IN, Siqueira JF Jr. Histobacteriologic Conditions of the Apical Root Canal System and Periapical Tissues in Teeth Associated with Sinus Tracts. *J Endod*. 2018;44(3):405–13.
 29. Ricucci D, Siqueira JF, Jr., Lopes WS, Vieira AR, Rôças IN. Extraradicular infection as the cause of persistent symptoms: a case series. *J Endod*. 2015;41:265-73.
 30. Rodriguez-Niklitschek C, Oporto GH. Clinical implications of *Enterococcus faecalis* microbial contamination in root canals of devitalized teeth: Literature review. *Rev Odontol Mexicana* 2015;19 (3): 177-82.
 31. Romualdo PC, de Oliveira KMH, Nemezio MA, Küchler EC, Silva RAB, Nelson-Filho P, Silva LAB. Does apical negative pressure prevent the apical extrusion of debris and irrigant compared with conventional irrigation? A systematic review and meta- analysis. *Aust Endod J*. 2017;43(3):129-37.
-

32. Sasanakul P, Ampornaramveth RS, Chivatxaranukul P. Influence of Adjuncts to Irrigation in the Disinfection of Large Root Canals. *J Endod*. 2019;45(3):332–7.
 33. Shetty VP, Naik BD, Pachlag AK, Yeli MM. Comparative evaluation of the amount of debris extruded apically using conventional syringe, passive ultrasonic irrigation and EndoIrrigator Plus system: An in vitro study. *J Conserv Dent*. 2017;20(6):411-4.
 34. Silva EJ, Teixeira JM, Kudsi N, Sassone LM, Krebs RL, Coutinho-Filho TS. Influence of Apical Preparation Size and Working Length on Debris Extrusion. *Braz Dent J*. 2016;27(1):28-31.
 35. Silva EJNL, Carapia MF, Lopes RM, et al. Comparison of apically extruded debris after large apical preparations by full-sequence rotary and single-file reciprocating systems. *Int Endod J*. 2016;49(7):700-5.
 36. Simezo AP, da Silveira Bueno CE, Cunha RS, et al. Comparative Analysis of Dentinal Erosion after Passive Ultrasonic Irrigation versus Irrigation with Reciprocating Activation: An Environmental Scanning Electron Study. *J Endod*. 2017;43(1):141-6.
 37. Siqueira JF Jr, De Uzeda M, Fonseca ME. A scanning electron microscopic evaluation of in vitro dentinal tubules penetration by selected anaerobic bacteria. *J Endod*. 1996;22(6):308–10.
 38. Siqueira JF Jr, Rôças IN, Favieri A, Machado AG, Gahyva SM, Oliveira JC, Abad EC. Incidence of postoperative pain after intracanal procedures based on an antimicrobial strategy. *J Endod*. 2002;28(6):457-60.
 39. Siqueira JF, Jr. Microbial causes of endodontic flare-ups. *Int Endod J*. 2003;36(1):453-63.
 40. Siqueira Junior JF, Rôças IDN, Marceliano-Alves MF, Pérez AR, Ricucci D. Unprepared root canal surface areas: causes, clinical implications, and therapeutic strategies. *Braz Oral Res*. 2018;3(1):65.
 41. T.Y. Huang, K. Gulabivala, Y. L. Ng A bio-molecular film ex-vivo model to evaluate the influence of canal dimensions and irrigation variables on the efficacy of irrigation. *Int Endod J*. 2008; 41(1): 60–71.
 42. Tambe VH, Nagmode PS, Vishwas JR, P SK, Angadi P, Ali FM. Evaluation of the Amount of Debris extruded apically by using Conventional Syringe, Endovac and Ultrasonic Irrigation Technique: An In Vitro Study. *J Int Oral Health*.
-

2013;5(3):63- 6.

43. Tanomaru-Filho M, Torres FF, Chávez-Andrade GM, Miano LM, Guerreiro-Tanomaru JM. Intermittent or continuous ultrasonically activated irrigation: micro-computed tomographic evaluation of root canal system cleaning. *Clin Oral Investig*. 2016;20(7):1541–6.
 44. Tasdemir T, Er K, Celik D, Yildirim T. Effect of passive ultrasonic irrigation on apical extrusion of irrigating solution. *Eur J Dent*. 2008;2(3):198-203.
 45. Teixeira JM, Cunha FM, Jesus RO, et al. Influence of working length and apical preparation size on apical bacterial extrusion during reciprocating instrumentation. *Int Endod J*. 2015;48(7):648-53.
 46. Usman N, Baumgartner JC, Marshall JG. Influence of instrument size on root canal debridement. *J Endod*. 2004;30(1):110–2.
 47. Vasconcelos LRSM, Midená RZ, Minotti PG, Pereira TC, Duarte MAH, Andrade FB. Effect of ultrasound streaming on the disinfection of flattened root canals prepared by rotary and reciprocating systems. *J Appl Oral Sci*. 2017;25(5):477-82.
 48. Verstraeten J, Jacquet W, De Moor RJG, Meire MA. Hard tissue debris removal from the mesial root canal system of mandibular molars with ultrasonically and laser- activated irrigation: a micro-computed tomography study. *Lasers Med Sci*. 2017;32(9):1965-70.
 49. Walsh LJ, George R. Activation of Alkaline Irrigation Fluids in Endodontics. *Materials (Basel)*. 2017; 23(1);10.
 50. Zeng C, Willison J, Meghil MM, Bergeron BE, Cutler CW, Tay FR, Niu L, Ma J. Antibacterial efficacy of an endodontic sonic-powered irrigation system: An in vitro study. *J Dent*. 2018;75(1):105-12.
-

ANEXOS

ANEXO A – COMITE DE ÉTICA

USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU DA
USP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Extrusão microbiana e contaminação intradentinária após a utilização da PUI e da CUI em diferentes momentos

Pesquisador: JESSICA DE ALMEIDA COELHO

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 02779018.8.0000.5417

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.055.215

Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto de mestrado para o estudo experimental *in vitro*, utilizando-se de 70 dentes incisivos inferiores permanentes humanos extraídos por necessidade terapêutica, cedidos por cirurgião-dentista. Será avaliada a extrusão de *Enterococcus faecalis* (ATCC29212) para a região periapical em dentes previamente contaminados durante o preparo biomecânico. A viabilidade de bactérias contidas nos túbulos dentinários, utilizando a irrigação ultrassônica passiva (PUI) e a irrigação ultrassônica contínua (CUI) em 3 momentos diferentes. Serão usados 70 incisivos inferiores humanos, contaminados com *E. faecalis* e divididos em 7 grupos (N=10) que passarão por diferentes protocolos de PUI e CUI. A coleta microbiológica do conteúdo extruído será efetuada e analisada pela contagem do número de UFC/mL (cultura microbiológica) e a viabilidade bacteriana será detectada por meio de microscópio confocal de varredura a laser (MCVL). Para a análise estatística, será utilizado a análise de variância (ANOVA) ou o teste Kruskal-Wallis, conforme a normalidade dos dados, com um nível de significância de 5%.

Objetivo da Pesquisa:

Estudar a relação entre a irrigação ultrassônica passiva (PUI) e a irrigação ultrassônica contínua (CUI) em três momentos diferentes da instrumentação, com a extrusão bacteriana periapical e a redução de micro-organismos nos túbulos dentinários.

Endereço: DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9
Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA **CEP:** 17.012-901
UF: SP **Município:** BAURU
Telefone: (14)3235-8356 **Fax:** (14)3235-8356 **E-mail:** cep@fob.usp.br

USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU DA
USP

Continuação do Parecer: 3.055.215

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Não haverá riscos diretos ao participante, pois para a pesquisa serão utilizados dentes humanos já extraídos (por motivos alheios e sem vínculo a este estudo) e devidamente doados pelo cirurgião - dentista.

Benefícios:

Elucidar qual o momento de utilização da agitação ultrassônica do irrigante que favorece melhor descontaminação intradentinária e menor extrusão bacteriana periapical do canal radicular, com chance de maior previsibilidade de sucesso em tratamentos endodônticos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de pesquisa experimental laboratorial com dentes humanos cedidos extraídos por necessidade terapêutica, cedidos por cirurgião-dentista.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram todos apresentados de acordo.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Esse projeto foi considerado APROVADO na reunião ordinária do CEP de 28/11/2018, com base nas normas éticas da Resolução CNS 466/12. Ao término da pesquisa o CEP-FOB/USP exige a apresentação de relatório final. Os relatórios parciais deverão estar de acordo com o cronograma e/ou parecer emitido pelo CEP. Alterações na metodologia, título, inclusão ou exclusão de autores, cronograma e quaisquer outras mudanças que sejam significativas deverão ser previamente comunicadas a este CEP sob risco de não aprovação do relatório final. Quando da apresentação deste, deverão ser incluídos todos os TCLEs e/ou termos de doação assinados e rubricados, se pertinentes.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
----------------	---------	----------	-------	----------

Endereço: DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9
Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA CEP: 17.012-901
UF: SP Município: BAURU
Telefone: (14)3235-8356 Fax: (14)3235-8356 E-mail: cep@fob.usp.br

**USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU DA
USP**

Continuação do Parecer: 3.055.215

Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1245013.pdf	07/11/2018 23:34:33		Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto.pdf	07/11/2018 23:33:23	JESSICA DE ALMEIDA COELHO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_de_Pesquisa.pdf	07/11/2018 12:11:40	JESSICA DE ALMEIDA COELHO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	IntencaoCessaoDentesCirurgiaoDentista.pdf	31/10/2018 06:48:41	JESSICA DE ALMEIDA COELHO	Aceito
Outros	QuestionarioTecnicoPesquisador.pdf	30/10/2018 13:32:03	JESSICA DE ALMEIDA COELHO	Aceito
Outros	Autorizacao_Uso_Equipamento.pdf	29/10/2018 22:07:48	JESSICA DE ALMEIDA COELHO	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	cep_docs_proj_pesquisa_carta_de_encaminhamento_termo_de_aquiescencia.pdf	29/10/2018 22:01:28	JESSICA DE ALMEIDA COELHO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	DeclaracaoCompromissoPesquisadorResultadosPesquisa.pdf	29/10/2018 21:46:55	JESSICA DE ALMEIDA COELHO	Aceito
Orçamento	Orcamento.pdf	29/10/2018 21:41:11	JESSICA DE ALMEIDA COELHO	Aceito
Cronograma	Cronograma.pdf	29/10/2018 21:35:06	JESSICA DE ALMEIDA COELHO	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BAURU, 04 de Dezembro de 2018

Assinado por:

Ana Lúcia Pompéia Fraga de Almeida
(Coordenador(a))

Endereço: DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9

Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA CEP: 17.012-901

UF: SP Município: BAURU

Telefone: (14)3235-8356 Fax: (14)3235-8356 E-mail: cep@fob.usp.br

ANEXO B – FIGURAS**Figura 1:** Preparo dos espécimes com a descontaminação da superfície

Legenda da fig.1: (A) Água oxigenada a 30%; (B) Hipoclorito de sódio a 2,5%; (C) Tiosulfato de sódio a 5%; (D) Coleta da superfície com cone de papel estéril; (E) Inserção do cone em BHI estéril; (F) Coleta do BHI para plaqueamento.

Figura 2: Aparato desenvolvido para posicionar o dente em estudo em uma posição de arco inferior e superior.

Legenda da fig. 2: (A) Espécime inserido em gel de agarose a 1,5% em posição inferior; (B) Instrumentação do espécime para posicionamento inferior; (C) Posicionamento do inserto para a agitação ultrassônica da solução; (D) Espécime inserido em gel de agarose a 1,5% em posição superior; (E) Vista oclusal do posicionamento superior; (F) Instrumentação do espécime em posicionamento superior.

Figura 3: Escaneamento em micro-CT de detritos dentinários extruídos e avaliação da viabilidade bacteriana intradentinária pela microscopia confocal de varredura a laser (MCVL)

Legenda da fig. 3: (A) Aparelho de microtomografia computadorizada (SkyScan); (B) Aparelho de Microscopia confocal de varredura a laser.

Figura 4: Avaliação da quantidade de UFC/mL extruídos

Legenda da fig.4: (A) Dispensa do inóculo em placas de ágar BHI; (B) Semeadura em placas de ágar BHI; (C) Contagem das UFC/mL de *Enterococcus faecalis*.

ANEXO C – Declaração**DECLARAÇÃO DE USO EXCLUSIVO DE ARTIGO EM DISSERTAÇÃO**

Declaramos estar cientes de que o trabalho **Extrusão microbiana e contaminação intradentinária após a utilização da PUI e da CUI em diferentes momentos** será apresentado na dissertação da aluna Jéssica de Almeida Coelho e que não foi e nem será utilizado em outra dissertação/tese dos Programas de Pós-graduação da FOB-USP.

Bauru, 27 de FEVEREIRO de 2020.

Jéssica A. Coelho

Jéssica de Almeida Coelho

Assinatura

Maricel Rosário Cardenas Cuellar

Assinatura

Evelyn Giuliana Velasquez-Espedilla

Assinatura

Rodrigo Ricci Vivan

Assinatura

Marco Antônio Húngaro Duarte

Assinatura

Flaviana Bombarda de Andrade

Assinatura