CAROLINA MASCHIETTO PUCINELLI

**RIZOGÊNESE INCOMPLETA: ANÁLISE COMPARATIVA DE DOIS TIPOS DE
IRRIGAÇÃO DE CANAIS RADICULARES, EM DENTES DE CÃES COM LESÃO
PERIAPICAL INDUZIDA**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção
do título de Mestre em Ciências. Programa: Odontopediatria
Área de Concentração: Odontopediatria

ORIENTADOR: PROF. DR. PAULO NELSON-FILHO

Ribeirão Preto
2015

AUTORIZAÇÃO PARA REPRODUÇÃO

Autorizo a reprodução e/ou divulgação total ou parcial da presente obra, por qualquer meio convencional ou eletrônico para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

CAROLINA MASCHIETTO PUCINELLI

FICHA CATALOGRÁFICA

Pucinelli, Carolina Maschietto

Rizogênese Incompleta: Análise comparativa de dois tipos de irrigação de canais radiculares, em dentes de cães com lesão periapical induzida. Ribeirão Preto, 2015.

109p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Odontopediatria.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Nelson-Filho

1. Lesão periapical 2. Irrigação por pressão apical negativa; 3. Irrigação convencional por pressão positiva; 4. Rizogênese incompleta.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Pucinelli CM. **Rizogênese Incompleta: Análise comparativa de dois tipos de irrigação de canais radiculares, em dentes de cães com lesão periapical induzida.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Mestre em Ciências.

Programa: Odontopediatria

Área de Concentração: Odontopediatria

Data da defesa: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof(a). Dr(a).: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a).: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a).: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

CAROLINA MASCHIETTO PUCINELLI

DADOS CURRICULARES

Nascimento	11 de agosto de 1989 – Indaiatuba/SP.
Filiação	Joab José Pucinelli Junior. Elena Cristina Maschietto Pucinelli.
2008-2011	Curso de Graduação. Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – FORP/USP.
2011-2011	Iniciação Científica – Projeto de pesquisa intitulado “Avaliação in vitro das propriedades físico-químicas de materiais obturadores de canais radiculares de dentes decíduos: liberação iônica, pH, condutividade e radiopacidade” (bolsa FAPESP). Orientador: Profa. Dra. Raquel Assed Bezerra Segato.
2013-2015	Curso de Especialização em Odontopediatria. Associação Odontológica de Ribeirão Preto – AORP – Monografia intitulada “Síndrome de Lennox-Gastaut: aspectos bucodentais relevantes para a Odontologia”. Orientador: Prof. Dr. Paulo Nelson-Filho.
2013-2015	Curso de Pós-Graduação em Odontopediatria, nível Mestrado. Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – FORP/USP – Dissertação intitulada “Rizogênese Incompleta: Análise comparativa de dois tipos de irrigação de canais radiculares, em dentes de cães com lesão periapical induzida” (bolsa CNPq). Orientador: Prof. Dr. Paulo Nelson-Filho.

DEDICATÓRIA

Aos meus avós Maria Elena Amaral Maschietto, Pedro Maschietto Filho, Diva Ribeira Pucinelli e Joab José Pucinelli:

Maria Elena Amaral Maschietto (*in memorian*): A falta que a vovó faz é imensa pois ela era e sempre será minha musa inspiradora e meu exemplo de pessoa! Porém agradeço a Deus pela oportunidade de ter conhecido e convivido com uma pessoa tão maravilhosa. Vó Elena, muito obrigada pelo amor incondicional que sempre teve por mim!

Ao meu avô **Pedro Maschietto Filho**, por sempre acreditar em mim. Sou muito feliz e honrada por ter sido presenteada por Deus em ser sua neta. Você é meu querido e eu amo muito você!

A minha avó **Diva Ribeira Pucinelli** (*in memorian*), pelo exemplo de mulher guerreira, enfrentando a vida com a cabeça erguida. Mesmo durante as adversidades não desistiu. Lutou até o último segundo de vida. Sou muito feliz por ter conhecido uma pessoa tão corajosa como a senhora.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu pai **Joab José Pucinelli Junior**, por toda sua história de vida. Sua vitória me inspira e faz com que nada seja impossível. Obrigada pelos valores que nos ensina a todo o momento, pelo exemplo ou mesmo em suas conversas filosóficas tão frequentes. Quero que saiba que tenho MUITO orgulho de você. Você faz parte do meu sucesso.

À minha mãe **Elena Cristina Maschietto Pucinelli**, meu porto seguro. Sempre tão cuidadosa e protetora. Muito obrigada por toda a dedicação que tem com a nossa família. Sei que o que eu sou hoje é porque você sempre esteve presente. Sou muito grata por ter você como minha mãe. Te amo!

À minha irmã **Tatiana Maschietto Pucinelli**, minha amiga e companheira de vida, tão amada. Muito obrigada por estar sempre presente. Amo você de todo o coração.

Ao meu irmão **Pedro Maschietto Pucinelli**, meu eterno bebê. Você veio para as nossas vidas para nos alegrar e o faz com muito sucesso. Obrigada por toda a alegria que traz à minha vida. Te amo muito!

Ao meu namorado **Anderson Benetti**, por estar presente nos momentos bons e nos difíceis, nesses últimos quatro anos. Obrigada por toda a paciência que você tem comigo. Saiba que sem você e sem o seu incentivo, o meu sucesso hoje não seria possível. Te amo!

A todos os meus queridos familiares e amigos que me apoiaram tanto nessa jornada. Obrigada pela paciência e carinho.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo Nelson-Filho, por tudo o que me ensinou ao longo desses anos de convívio. Pela paciência e pela dedicação com meu crescimento pessoal e profissional. Sempre fonte de inspiração e referência como profissional dedicado e professor carinhoso. Pronto a ajudar a todos que o procuram, sempre com a excelência que lhe é inerente. Tenho imenso orgulho de ter sido sua orientada. Muito obrigada pelos ensinamentos, por todos os puxões de orelha e pelas palavras amigas.

À Profa. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva, pois sem a senhora esse trabalho não seria possível. Muito obrigada por todos os ensinamentos durante a confecção dessa tese, bem como pelas aulas que tive a honra de assistir. Foi um privilégio para mim poder ter convivido durante esses anos com a senhora, pois é uma fonte de inspiração a todos da Odontopediatria. Muito obrigada.

À minha amiga Priscilla Coutinho Romualdo, por toda a ajuda nesse trabalho. Sempre tão carinhosa e sempre disposta a ajudar. Muito obrigada.

À Dra. Marília Pacífico Lucisano, pela disponibilidade e paciência. Você foi fundamental para o meu crescimento profissional. Sempre muito delicada, foi um exemplo para mim.

AGRADECIMENTOS

À Universidade de São Paulo, na pessoa do atual Reitor, **Prof. Dr. Marco Antonio Zago**, e do Vice-Reitor, **Prof. Dr. Vahan Agopyan**.

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa do atual Diretor, **Prof. Dr. Valdemar Mallet da Rocha Barros**, e da Vice-Diretora, **Prof^a. Dr^a. Léa Assed Bezerra da Silva**.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa da Coordenadora, **Prof^a. Dr^a. Léa Assed Bezerra da Silva** e da Vice-Coordenadora **Prof^a. Dr^a. Raquel Assed Bezerra Segato**.

Ao **CNPq** (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pela bolsa concedida.

Aos professores da disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo:

Profa. Dra. Aldevina Campos de Freitas, exemplo de dedicação à Odontopediatria. Obrigada pelo carinho e por toda a ajuda e conhecimento.

Profa. Dra. Alexandra Mussolino de Queiroz, por todos os momentos de cumplicidade e por tudo o que me ensinou desde a Graduação. Sempre muito carinhosa e atenciosa. Sou muito feliz por ter você como um exemplo de pessoa e de profissional. Desejo sempre estar ao seu lado para continuar compartilhando ensinamentos e experiências.

Profa. Dra. Andiará De Rossi, por toda a paciência e pela disponibilidade sempre que precisei. Muito obrigada pelas palavras de incentivo.

Profa. Dra. Kranya Victoria Díaz Serrano, pela atenção. Obrigada por todos os ensinamentos transmitidos durante as atividades clínicas.

Profa. Dra. Maria Cristina Borsatto, pela amizade, carinho e convivência sempre tão agradável. Obrigada por todos os ensinamentos e motivação.

Profa. Dra. Raquel Assed Bezerra da Silva, minha ex e futura orientadora. Muito obrigada por sempre estar presente na minha vida. Saiba que sem você eu nem teria entrado nessa vida de Pós Graduação. Sempre tão positiva e prestativa, você foi a minha maior incentivadora nesses anos. Muito obrigada por toda a ajuda, pelos momentos de alegria e por todos os ensinamentos.

Aos professores da disciplina de Ortodontia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo: **Prof. Dr. Fábio Lourenço Romano**, **Prof. Dr. José Tarcísio Lima Ferreira**, **Prof. Dr. Adilson Thomazinho**, **Profa Dra. Mírian Aiko Nakane Matsumoto** e **Profa. Dra. Maria Bernadete Sasso Stuaní** e à professora da Disciplina de Epidemiologia **Profa. Dra. Maria da Conceição Pereira Saraiva**, pela simpatia e pela convivência agradável no mesmo Departamento.

Ao **Prof. Dr. Nestor Cohenca**, professor da Universidade de Washington, por toda a colaboração na elaboração desse trabalho.

Aos Funcionários do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto:

Dr. Francisco Wanderlei Garcia de Paula e Silva, pela convivência agradável, pelos ensinamentos transmitidos, pela disponibilidade e pelo auxílio nas atividades clínicas.

Dra. Carolina Paes Torres Mantovani, pela amizade, pelas conversas e por sempre ter me incentivado. Muito obrigada por todo o apoio.

Marco Antônio dos Santos, por toda a ajuda nas atividades laboratoriais deste trabalho e pelos momentos de convivência agradável que compartilhamos.

Nilza Letícia Magalhães, sempre tão sorridente e prestativa. Obrigada por toda a paciência que teve comigo e por todo o auxílio no desenvolvimento desse trabalho.

Fátima Aparecida Jacinto Daniel pela ajuda nas atividades laboratoriais e pelo convívio sempre muito agradável.

Filomena Leli Placciti e Matheus Morelli Zanela, por toda a atenção, paciência e, principalmente, pela convivência agradável.

Micheli Cristina Leite Rovanholo, por todo o apoio e pela imensurável paciência. Sempre me ajudando mesmo quando eu achava que não seria possível. Mi, muito obrigada pela motivação, dedicação e pelo carinho.

Aos funcionários das clínicas, **Benedita Viana Rodrigues, Fátima Aparecida Rizoli, Vera do Nascimento Scandelai e Karina Dadalt Quaglio**, por todo o apoio e pela simpatia com que vocês tratam todos os alunos e pacientes.

À **Dra. Érika Calvano Kuchler**, por toda a ajuda oferecida, sempre muito dedicada ao trabalho e à pesquisa, animando aos que a rodeiam.

Aos colegas da Pós-Graduação em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, **Ana Caroline Fumes, Cintia Guimarães de Almeida, Claudia María Carpio Bonilla, Daniela Silva Barroso de Oliveira, Daniele Lucca Longo, Danielly Cunha Araújo Ferreira, Denise de Souza Matos, Driely Barreiros de Oliveira, Elaine Machado Pingueiro Okada, Karina Alessandra Michelão Grecca Pieroni, Katharina Morant Holanda de Oliveira, Késsia Suênia Fidélis de Mesquita Guimarães, Larissa Nogueira Soares Ribeiro, Laura Alves Bastos, Leonardo Gontijo Matos, Lidia Regina da Costa Hidalgo, Maria Gabriela Flores Bracho, Mariana Alencar Nemezio, Mariele Andrade do Nascimento, Nicole Gonçalves Lima, Patricia Maria Monteiro, Paula Regina Avila Silvano, Priscilla Coutinho Romualdo, Raquel Fernanda Bachiega Morelli, Rodrigo Alexandre Valerio, Silvana Aparecida Fernandes Polizeli, Talitha de Siqueira Mellara e Thaís Aparecida Xavier**, pela troca de confidências, pelas experiências vividas e por todos os momentos agradáveis que compartilhamos!

Às amigas de turma do mestrado, **Francine Lorencetti da Silva, Juliana Arid, Mariana de Oliveira Daltoé, Marina Moscardini Vilela, Sara Silva de Oliveira e Sofia Sampaio Meireles de Sousa**: vocês se tornaram muito especiais nesses anos de convivência. Tenho muito carinho por vocês! Muito obrigada por todos os momentos de alegria e cumplicidade. Obrigada pelas palavras de carinho, pelo apoio e por dividirem comigo esses momentos únicos de pós-graduandas.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

INTRODUÇÃO 21

PROPOSIÇÃO 29

MATERIAL E MÉTODOS 33

RESULTADOS 45

DISCUSSÃO 87

CONCLUSÃO 95

REFERÊNCIAS 99

ANEXO 107

RESUMO

Pucinelli, CM. **Rizogênese Incompleta: Análise comparativa de dois tipos de irrigação de canais radiculares, em dentes de cães com lesão periapical induzida.** Ribeirão Preto, 2015. 109p Dissertação [mestrado]. Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

A lesão periapical é uma doença causada por micro-organismos presentes no sistema de canais radiculares, assim como por seus produtos e subprodutos e pelas reações desencadeadas no organismo. A base para a obtenção do sucesso pós-tratamento endodôntico é o controle da infecção. Com essa finalidade, novos sistemas de irrigação dos canais radiculares têm sido desenvolvidos, no qual a irrigação por Pressão Apical Negativa (EndoVac®) tem se destacado. O objetivo desse estudo *in vivo* foi efetuar uma avaliação histopatológica, histoenzimológica e histomicrobiológica, comparando o sistema EndoVac® com a irrigação convencional, em dentes de cães com rizogênese incompleta e lesão periapical crônica induzida experimentalmente. Um total de 52 canais radiculares de pré-molares com rizogênese incompleta foram aleatoriamente divididos em 4 grupos: Grupo I - Irrigação com EndoVac® (n=15); Grupo II - Irrigação Convencional (n=17); Grupo III – Dente hígido (controle negativo) (n=10) e Grupo IV – Dente com lesão e sem tratamento (controle positivo) (n=10). Após indução de lesões periapicais nos dentes dos Grupos I, II e IV, os dentes dos grupos I e II foram instrumentados com limas manuais, empregando o EndoVac® e a irrigação convencional, respectivamente. Decorridos 90 dias, os animais foram eutanasiados e os espécimes submetidos ao processamento histotécnico para a análise histopatológica morfológica e morfométrica em cortes corados com HE, sob microscopia convencional e de fluorescência. Foi realizada também a histoenzimologia para a Fosfatase Ácida Resistente ao Tartarato (TRAP), para a marcação de osteoclastos, e a coloração de Brown e Brenn, para avaliar a presença de bactérias, sua localização e concentração/intensidade. Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística por meio dos testes de qui-quadrado, Fisher, Anova e pós-teste de Tukey. O nível de significância adotado foi de 5%. Os resultados obtidos na avaliação dos parâmetros histopatológicos evidenciaram diferença significativa entre os Grupos I e II ($p<0,05$), observando-se no Grupo I predomínio de infiltrado inflamatório de menor magnitude, menor espessura do ligamento periodontal e menor reabsorção dos tecidos mineralizados. Embora não tenha sido verificada diferença significativa entre esses grupos com relação à extensão das lesões periapicais em microscopia de fluorescência, e com relação à presença, localização e intensidade da contaminação bacteriana, foi observado menor número de osteoclastos no Grupo I ($p<0,05$). Os resultados do presente estudo *in vivo* permitiram concluir que a irrigação por pressão apical negativa (EndoVac®) apresentou melhores resultados biológicos, quando comparada à irrigação convencional, favorecendo a ocorrência do processo de reparo, em dentes com rizogênese incompleta e lesão periapical.

Palavras-chave: Rizogênese incompleta; Lesão periapical; Irrigação por pressão apical negativa; Irrigação convencional por pressão positiva.

ABSTRACT

Pucinelli, CM. **Immature teeth: comparative analysis of two types of root canals irrigation, in dogs's teeth with induced apical periodontitis.** Ribeirão Preto, 2015. 109p. Dissertação [mestrado]. Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

The apical periodontitis is a disease caused by microorganisms from the root canal system, as well as their products, by-products and the reactions triggered in the host. The post-endodontic treatment success is based in the control of the infection. For this purpose, new irrigation systems of root canals have been developed, in which apical Negative Pressure (EndoVac®) have been highlighted. The objective of this *in vivo* study was to perform a histopathological, histoenzymology and histomicrobiologic evaluation, comparing the EndoVac® system with the conventional irrigation, in immature teeth of dogs with apical periodontitis experimentally induced. A total of 52 root canals of immature pre-molars were randomly assigned into 4 groups: Group I - EndoVac® Irrigation (n= 15); Group II - Conventional Irrigation (n= 17); Group III – Sound Tooth (negative control) (n= 10) and Group IV - Tooth with apical periodontitis without treatment (positive control) (n= 10). After induction of apical periodontitis in teeth of the Groups I, II and IV, in the groups I and II, the teeth were instrumented with manual files, using EndoVac® and conventional irrigation, respectively. After 90 days, the animals were euthanized and the specimens subjected to histotechnic for histopathological, morphologic and morphometric analysis in HE-stained sections, under conventional and fluorescence microscopy. The histoenzymology for the phosphatase-Resistant Acid tartrate (TRAP), for the identification of osteoclasts, and the Brown and Brenn staining method to assess the presence of bacteria, their location and concentration/intensity were also performed. The results obtained were subjected to statistical analysis using the chi-square test, Fisher exact test, ANOVA and Tukey post-test. The level of significance was set at 5%. The results obtained in the evaluation of histopathological parameters demonstrated a significant difference between groups I and II ($p < 0.05$). In the Group I, the predominance was inflammatory infiltrate of low magnitude, small thickness of the periodontal ligament and less resorption of mineralized tissues. Although the periapical lesions extension in fluorescence microscopy, and the presence, location, and intensity of bacterial contamination was not significant different between these groups, a lower number of osteoclasts in Group I ($p < 0.05$) was observed. The results of this *in vivo* study allowed us to conclude that the irrigation with EndoVac® presents best biological results in relation to conventional irrigation, favored the occurrence of the repair process, in immature teeth with apical periodontitis.

Key words: Immature teeth, Apical periodontitis, apical negative pressure irrigation, apical positive pressure irrigation (conventional irrigation).

Introdução

INTRODUÇÃO

Na cavidade bucal há mais de 1000 espécies de micro-organismos (Wilson, 2004). Quando o tecido pulpar é exposto, esses micro-organismos podem ter acesso à polpa dental, ocasionando inflamação desse tecido. No entanto, devido à diminuição gradual da tensão de oxigênio no interior dos canais radiculares e devido às interações nutricionais, ocorre um “shift” microbiano, passando a observar-se predominância de micro-organismos anaeróbios, particularmente Gram-negativos (Sundqvist, 1992). Durante esse processo, há destruição do tecido pulpar com produção de anticorpos, ativação do sistema complemento e liberação de mediadores inflamatórios (Rietschel e Brade, 1992; Matsushita et al., 1999; Desai et al., 2011). A liberação desses mediadores resulta também na osteoclastogênese e reabsorção progressiva dos tecidos mineralizados, incluindo o cimento, a dentina e o osso alveolar (Stashenko, 1990; Nelson-Fillho et al., 2002; Jiang et al., 2003; Velickovic et al., 2015), com estabelecimento da lesão periapical.

Outro aspecto importante é que nos dentes com lesão periapical crônica visível radiograficamente os micro-organismos estão disseminados por todo o sistema de canais radiculares, ou seja, canal principal, túbulos dentinários, lacunas cementárias, erosões apicais e no biofilme apical (Leonardo et al., 2002; Assed et al., 2005; Rocha et al., 2008; Kwang e Abbott, 2014).

Assim, considera-se que a lesão periapical é uma doença causada primariamente por micro-organismos presentes no sistema de canais radiculares (Sundqvist, 1992), assim como por seus produtos e subprodutos, e que a base para a obtenção do sucesso pós-tratamento endodôntico é o controle da infecção (Sjogren et al., 1997; Kawashima et al., 2009; Cohenca et al., 2010; Vieira et al., 2012). Esse controle pode ser clinicamente obtido por meio do tratamento endodôntico, representado por uma sequência de etapas que incluem o preparo biomecânico, o uso da medicação intra-canal e a obturação, as quais visam reduzir a infecção microbiana (Leonardo, 2005; Assed, 2005; Ito et al., 2011).

Com relação ao preparo biomecânico sabe-se que, após sua realização, independentemente da técnica escolhida, há permanência de micro-organismos tanto nas paredes dos canais radiculares (Peters et al., 2002; Siu e Baumgartner, 2010),

quanto difundidos no sistema de canais radiculares (Tronstad et al., 1987; Leonardo et al., 2002; Rocha et al., 2008; Silva et al., 2009). Estudos evidenciaram que mesmo com a utilização de instrumentos rotatórios de Níquel-Titânio, há permanência de micro-organismos nessas áreas (Siqueira et al., 2013; Marinho et al., 2014).

A fim de elevar a porcentagem de redução da microbiota pós-instrumentação dos canais radiculares, o estudo de novas soluções irrigadoras e técnicas inovadoras para irrigação torna-se relevante, do ponto de vista clínico. A irrigação é um passo importante (Cohenca et al., 2015) pois, quando associada ao preparo biomecânico, é capaz de otimizar a limpeza dos canais radiculares (Bystrom e Sundqvist, 1981; Saber e Hashem, 2011). Seus principais objetivos são remoção de detritos, lubrificação dos canais radiculares e dissolução de material orgânico e inorgânico, além da atividade antimicrobiana (Basrani, 2011).

Para que esses objetivos sejam atingidos, o sistema de irrigação deve ser efetivo em todo o comprimento de trabalho (Nair, 2004), incluindo o terço apical e as demais regiões não instrumentadas do canal radicular (Abarajithan et al., 2011). No entanto, a irrigação convencional por pressão positiva, rotineiramente utilizada, é capaz de levar a solução irrigadora até no máximo 1mm da ponta da agulha, sendo relativamente ineficaz na limpeza das paredes do terço apical dos canais radiculares (Ram, 1977; Salzgeber e Brilliant, 1977; Boutsikis et al., 2009; Bronnec et al., 2010). Além disso, quanto mais próximo ao ápice estiver a agulha, maior a probabilidade de extrusão inadvertida de solução irrigadora para os tecidos periapicais (Druttman e Stock, 1989), podendo resultar em danos severos e dor pós-operatória (Hülsmann e Hahn, 2000; Desai e Himel, 2009; Michell et al., 2010).

Estudos biológicos prévios avaliando a técnica de irrigação convencional, em dentes de cães com lesão periapical crônica e rizogênese completa, demonstraram que após sua realização há permanência de infiltrado inflamatório e de áreas de reabsorção de superfície (De Rossi et al., 2005; Silveira et al., 2007). Ainda, pode-se observar reabsorção radicular externa cementária e dentinária em 80% dos casos (Paula-Silva et al., 2009).

Contrariamente à irrigação convencional, que emprega pressão positiva, foi lançado no comércio odontológico especializado americano, no ano de 2007, um sistema de irrigação chamado EndoVac[®] (Discus Dental, Culver City, CA, EUA), o qual funciona por pressão apical negativa e consiste em uma seringa descartável, macrocânula e microcânula. De acordo com as instruções do fabricante, o sistema deve ser empregado utilizando duas fases: a macroirrigação e a microirrigação. A ponta que promove a irrigação/aspiração é inserida em uma seringa de irrigação descartável, adaptada à alta velocidade de sucção do equipo odontológico. A ponta de irrigação/aspiração libera a solução irrigadora na câmara pulpar e o excesso pode ser removido tanto pela macro quanto pela microcânula. A macrocânula é plástica e apresenta uma abertura final medida de acordo com os padrões da *International Organization for Standardization* (ISO) no calibre de 55 (ou 0,55mm) com *taper* 0,2. Já a microcânula, de aço inoxidável e com uma extremidade fechada, apresenta doze pequenos orifícios posicionados lateralmente e calibre de acordo com os padrões ISO de 32 (ou 0,32mm). O sistema EndoVac[®] permite a utilização de um volume maior de solução irrigadora, quando comparado ao sistema de irrigação convencional (seringa/cânula), no mesmo intervalo de tempo (Nielsen e Baumgartner, 2007).

Em 2009, Desai e Himel demonstraram que não há extrusão de solução irrigadora para a região periapical, durante a utilização do sistema EndoVac[®], enquanto que Fukumoto et al. (2006) e Velmurugan et al. (2014) identificaram, em estudos *ex vivo* e *in vitro*, uma reduzida extrusão de irrigante além do forame apical, após o uso desse sistema, em dentes permanentes com rizogênese completa. Além disso, no mesmo estudo, Fukumoto et al. (2006) demonstraram que a remoção da “smear layer” quando foi utilizado o EndoVac[®] foi superior, em comparação à irrigação convencional. Em 2015, Adorno et al. verificaram que o sistema EndoVac[®] possibilita a distribuição da solução irrigadora por todo o Comprimento de Trabalho.

Segundo Hockett et al. (2008), Silva et al. (2010) e Cohenca et al. (2013), o sistema EndoVac[®] pode ser considerado um protocolo de desinfecção eficaz para o controle de micro-organismos, em dentes com lesão periapical, inclusive nos casos de rizogênese incompleta (Cohenca et al., 2010; Rodríguez-Benítez et al., 2014). Ainda, segundo Nielsen e Baumgartner (2007), Shin et al.

(2010), Abarajithan et al. (2011), Gade et al. (2013), Alkahtani et al. (2014) e Dua e Dua (2015), esse sistema remove maior quantidade de debris, principalmente no terço apical, quando comparado à irrigação convencional. Em 2014, Kara Tuncer e Unal evidenciaram que, após o uso do EndoVac[®], houve maior penetrabilidade do material obturador nas paredes do canal radicular, principalmente no terço apical.

No entanto, apesar do sistema EndoVac[®] estar sendo foco de pesquisas conduzidas por diferentes grupos em todo o mundo, com 78 trabalhos publicados até maio de 2015 de acordo com a base de dados PubMed, a grande maioria desses estudos avaliaram principalmente a extrusão de debris para a região apical e a atividade antimicrobiana. Estudos avaliando as reações teciduais, publicados na literatura específica até o momento, são escassos (Silva et al., 2010; Cohenca et al., 2015), porém salientam que o uso da irrigação por pressão apical negativa (EndoVac[®]) é um avanço importante para a obtenção do processo de reparo.

Especificamente com relação aos dentes com rizogênese incompleta, denomina-se “apicigênese” o termo histológico empregado para descrever o desenvolvimento radicular fisiológico contínuo e a formação do ápice radicular (AAPD, 2014/2015). Dentes com rizogênese incompleta são aqueles que radiograficamente não atingiram o estágio 10 de Nolla e histologicamente não apresentam toda a camada de dentina radicular revestida por cimento. Por essa razão, a morfologia interna das raízes desses dentes são peculiares, com paredes finas e frágeis e abertura apical acentuadamente ampla (Silva et al., 2005). Essas características morfológicas dificultam o tratamento endodôntico, quando ocorre necrose pulpar nesses dentes, uma vez que a limpeza mecânica dos canais radiculares, mesmo com limas de maior calibre, não é efetiva e não promove a conformação convencional para o travamento do cone de guta-percha principal, levando a um maior risco de sobreobturação e selamento apical incompleto (Leonardo et al., 1993). Além disso, os dentes com rizogênese incompleta apresentam o canal radicular com forma elíptica, sendo maior no sentido vestibulo-lingual que no méso-distal, o que radiograficamente não permite avaliar com precisão a obturação radicular (Silva et al., 2005).

Alguns autores demonstraram que há correlação entre dentes com rizogênese incompleta (ápice aberto) e o aumento do risco de injeção inadvertida da solução irrigadora nos tecidos periapicais (Aksel et al., 2014; Velmurugan et al., 2014). Nesse sentido, Parente et al. (2010), comparando *in vitro* o extravasamento de solução irrigadora em sistemas que mimetizavam ápices abertos e fechados observaram que, ao contrário do esperado, o EndoVac[®] teve sua eficiência semelhante tanto em dentes com rizogênese incompleta quanto em dentes com rizogênese completa.

No entanto, não há trabalhos publicados, até o momento, comparando sistemas de irrigação que empregam a pressão apical negativa aos sistemas de irrigação convencional, do ponto de vista biológico, em dentes com rizogênese incompleta, justificando a realização de estudos com esse objetivo, a fim de fornecer maior respaldo para a indicação clínica.

Proposição

Proposição

Objetivo geral:

O objetivo desse estudo *in vivo* foi efetuar uma avaliação histopatológica, histoenzimológica e histomicrobiológica, comparando o sistema convencional de irrigação (pressão positiva) com o EndoVac[®] (pressão apical negativa), em dentes de cães com rizogênese incompleta e lesão periapical crônica induzida.

Objetivos específicos:

- Avaliar as regiões apical e periapical em microscopia de luz convencional, em cortes corados pela Hematoxilina e Eosina (HE).
- Mensurar a extensão da área correspondente às lesões periapicais por microscopia de fluorescência.
- Avaliar a presença e localização de bactérias e a concentração/intensidade bacteriana, pela coloração Brown e Brenn modificada.
- Realizar a histoenzimologia (TRAP) para a marcação e contagem de osteoclastos.

Material E Métodos

MATERIAL E MÉTODOS

O projeto de pesquisa foi, inicialmente, submetido à apreciação pelo Comitê de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, tendo sido aprovado (Processo nº 006/2012). O estudo teve como base os protocolos recomendados pela *International Organization for Standardization* (ISO standard 7405:2008) e por trabalhos previamente publicados (Silva et al., 2012; Cohenca et al., 2015).

Grupos Experimentais

Foram utilizados 3 cães da raça Beagle, com 4 meses de idade, os quais foram mantidos em quarentena e receberam vermífugos, suplementos vitamínicos e vacinas antirrábica e tríplice para que estivessem em condições adequadas para a realização do experimento. Os cães ficaram alojados no Biotério da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (FORP/USP), com livre acesso à água e ração padrão do laboratório durante todo estudo. Foram selecionados os segundos e terceiros pré-molares superiores e segundos, terceiros e quartos pré-molares inferiores, com rizogênese incompleta, totalizando 30 dentes (60 raízes), os quais foram divididos em 4 grupos (Tabela 1).

Tabela 1 - Distribuição dos grupos experimentais e grupos controle

Procedimentos	
Grupo I	Irrigação com pressão apical negativa (EndoVac®) (Grupo experimental: 10 dentes; 20 raízes)
Grupo II	Irrigação convencional com pressão positiva (Grupo experimental: 10 dentes; 20 raízes)
Grupo III	Dentes hígidos, sem tratamento endodôntico (Grupo controle: 5 dentes; 10 raízes)
Grupo IV	Dentes com lesão periapical induzida, sem tratamento endodôntico (Grupo controle: 5 dentes; 10 raízes)

Indução das Lesões Periapicais

Todos os dentes foram examinados radiograficamente para confirmação da presença de rizogênese incompleta, antes do início do estudo. Os animais foram pré-anestesiados por meio de injeção endovenosa de Neozine (Farmácia Aventis Ltda., São Paulo, SP, Brasil; 1mg/Kg de peso corpóreo), 15 minutos antes do procedimento operatório quando, então, foram anestesiados com injeção endovenosa de cloridrato de tiletamina/cloridrato de zolazepam (Zoletil 50; Virbac do Brasil Ind. e Com Ltda., São Paulo, SP, Brasil; 0,1mL/kg de peso corpóreo) para facilitar a passagem do tubo endotraqueal. A anestesia inalatória com isoflurano (Abbott Laboratories Ltd., St. Laurent, Quebec, Canadá) foi efetuada usando o aparelho Takaoka KT-20 (Takaoka Indústria e Comércio Ltda, São Paulo, SP, Brasil). Durante todo o procedimento operatório, os animais foram mantidos com solução salina isotônica (NaCl a 0,9%-Glicolabor Indústria Farmacêutica Ltda., Ribeirão Preto, SP, Brasil).

Nos grupos I, II e IV, foi realizada a abertura coronária com pontas esféricas diamantadas, complementada com pontas diamantadas tronco-cônicas (KG Sorensen, São Paulo, SP, Brasil), sob refrigeração abundante. Foi realizada a remoção do tecido pulpar coronário e radicular e os canais radiculares foram mantidos expostos na cavidade bucal durante 7 dias, conforme preconizado por Leonardo et al. (1993), para possibilitar a contaminação microbiana. Após esse período, a câmara pulpar foi selada com cimento de óxido de zinco e eugenol (S.S. White, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), a fim de promover a indução das lesões periapicais.

Radiografias padronizadas foram realizadas inicialmente em 15 dias e após intervalos de 5 dias, até que a rarefação óssea periapical fosse observada radiograficamente, indicando o desenvolvimento da lesão periapical, o que geralmente ocorre entre 15 e 25 dias, em dentes com rizogênese incompleta (Leonardo et al., 1993).

Neutralização do Conteúdo Necrótico

Após a indução das lesões periapicais, os dentes dos grupos I e II foram isolados com dique de borracha e o campo operatório submetido à anti-sepsia com peróxido de hidrogênio a 30%, até não haver mais borbulhamento do peróxido, seguido do uso de tintura de iodo. Após secagem, o selamento temporário foi removido e foi iniciada a neutralização do conteúdo necrótico no sentido coroa-ápice, sob constante irrigação com hipoclorito de sódio (NaOCl) a 2,5%, com um volume de no mínimo 3,6mL de solução a cada troca de instrumento, até o Comprimento de Trabalho Provisório, situado a aproximadamente 3mm do ápice radiográfico. Em seguida, foi efetuada a odontometria, para determinação do Comprimento Real de Trabalho (CRT), estabelecido 1mm aquém do ápice radiográfico, seguida de complementação da neutralização do conteúdo séptico-tóxico até esse limite.

Instrumentação e Irrigação dos Canais Radiculares

Grupo I – Irrigação com pressão apical negativa (sistema EndoVac®)

Os canais radiculares foram instrumentados no CRT, usando limas tipo K, até o calibre 70. Neste grupo, foi utilizada a irrigação com pressão apical negativa (sistema EndoVac®; Discus Dental), durante a instrumentação. Embora o protocolo recomendado para o uso deste sistema envolva 2 fases (macroirrigação e microirrigação), neste trabalho os canais radiculares foram irrigados apenas com a macrocânula, como preconizado por Silva et al. (2010), devido ao tamanho apical aumentado dos dentes com rizogênese incompleta.

Durante a macroirrigação, 10mL de solução de NaOCl a 2,5% foram utilizados empregando a ponta de irrigação principal na abertura coronária. A macrocânula foi, então, retirada do canal radicular, mantendo-o totalmente preenchido com a solução irrigadora.

Todos os canais radiculares receberam irrigação final com solução salina esterilizada e foram secos com pontas de papel absorvente esterilizadas. Por fim, os dentes foram restaurados com selamento duplo, por meio do uso de ProRoot MTA (Dentsply Tulsa Dental, Johnson City, TN) e amálgama de prata (Sybraloy; Kerr Corporation, Orange, CA).

Grupo II – Irrigação com pressão apical positiva (Irrigação convencional)

Neste grupo, os canais radiculares foram instrumentados no CRT, com limas tipo K, até o calibre 70, empregando-se irrigação com pressão apical positiva (irrigação convencional). A irrigação foi efetuada usando agulha esterilizada de calibre 30 (Max-i-Probe; Dentsply/Tulsa Dental, York, PA) conectada a uma seringa. A seringa foi preenchida com NaOCl a 2,5% e a agulha foi introduzida no canal radicular até o comprimento de trabalho, sempre acompanhada pela cânula de aspiração. Cada canal radicular foi irrigado com pressão leve e 10mL de NaOCl a 2,5%. Todos os canais radiculares receberam irrigação final com solução salina esterilizada e foram secos com pontas de papel absorventes esterilizadas. Os dentes foram restaurados com selamento duplo, como descrito para o Grupo I.

Grupos III (dentes hígidos e sem tratamento endodôntico) e IV (dentes com lesão periapical e sem tratamento endodôntico)

O Grupo III (controle negativo), foi composto por dentes hígidos, sem tratamento endodôntico.

No Grupo IV (controle positivo) foram induzidas lesões periapicais, porém os canais radiculares não receberam tratamento endodôntico. Após a indução das lesões, os dentes foram selados com MTA e amálgama de prata, como realizado nos Grupos I e II.

Durante todo o experimento e período pós-operatório, os cães foram monitorados diariamente, contando com o auxílio de um médico veterinário.

Processamento Histotécnico e Avaliação Microscópica

Decorridos 90 dias, os animais foram submetidos à eutanásia por sobredose endovenosa de pentobarbital sódico. As maxilas e mandíbulas contendo os dentes foram dissecadas e seccionadas para se obter raízes individuais, as quais foram fixadas em formalina tamponada a 10% por 48 horas à temperatura ambiente e, em seguida, lavadas por aproximadamente 8 horas em água corrente. Em seguida, para a descalcificação das peças, foi utilizada solução à base de EDTA a 20% (pH 7,4). As peças foram mantidas nesta solução, à temperatura ambiente sob

constante agitação. A solução desmineralizadora foi trocada semanalmente até a completa descalcificação das amostras, avaliada por meio da penetração de uma agulha nos tecidos para verificação da sua consistência. Decorridos aproximadamente 30 dias, as peças desmineralizadas foram neutralizadas em solução de sulfato de sódio a 5% (Sulfato de Sódio Anhidro; J.T.Baker, Xalostoc, México) por 24 horas, lavadas em água corrente por 12 horas, desidratadas em concentrações crescentes de álcool (Álcool Etílico Absoluto Anhidro; J.T.Baker), diafanizadas em xilol (Xilol; Merck) e incluídas em parafina (Histosec Pastillen; Merck). Os blocos contendo os dentes foram cortados longitudinalmente em micrótomo (Leica RM2145; Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemanha) no sentido méso-distal. Cortes semi-seriados de 5µm, com intervalos de 15µm, foram obtidos em toda a extensão da lesão periapical, exceto na região do forame apical, onde todos os cortes foram coletados sem intervalos e, então, corados com hematoxilina e eosina (HE).

A análise dos cortes foi efetuada em microscópio Axio Imager.M1 (Zeiss, Göttingen, Germany) acoplado a uma câmera Axiocam MRc5 (Zeiss, Göttingen, Germany). Realizou-se uma descrição completa das características das regiões apicais e periapicais de cada grupo e foram atribuídos escores aos seguintes parâmetros histopatológicos avaliados:

a) Infiltrado inflamatório periapical:

- ausente (escore 0);
- suave (escore 1);
- moderado (escore 2); ou
- severo (escore 4).

b) Espessura do ligamento periodontal na região apical:

- normal (escore 0);
- levemente aumentada (escore 1);
- moderadamente aumentada (escore 2); ou
- severamente aumentada (escore 3).

c) Reabsorção de cimento, dentina e osso:

- ausente (escore 0); ou
- presente (escore 1).

Morfometria em Microscopia de Fluorescência

Nos Grupos I, II e IV foi efetuada a análise morfométrica da extensão das lesões periapicais utilizando os espécimes corados com HE, utilizando o microscópio Axio Imager.M1, em aumento de 10x, operando no modo fluorescente, conforme descrito por De Rossi et al. (2008), Silva et al. (2012) Bezerra da Silva et al., 2014 e de Oliveira et al. (2015). Utilizou-se o filtro Alexa Fluor 488 (AF488) com as seguintes características: excitação de G365, refletores FT395 e emissão LP420. Para cada espécime, a extensão (área) da lesão periapical foi delineada e mensurada em μm^2 , empregando o software Axio Vision Rel 4.8. A delimitação da lesão excluiu as estruturas intactas (ligamento periodontal, cimento e osso alveolar), facilmente identificadas pela forte fluorescência verde, e incluiu áreas de reabsorção e infiltrado inflamatório, identificadas pela ausência de fluorescência e aparência escurecida.

Foi efetuada a mensuração nos espécimes do Grupo III (dentes hígidos; controle negativo), a fim de estabelecer a espessura do ligamento periodontal sadio, na região apical. Para isso, foi traçada uma linha perpendicular à raiz, situada 0,5mm acima da abertura apical de cada espécime, delimitando assim a altura máxima da medição da área do ligamento periodontal (Figura 1).

Figura 1- Representação da mensuração nos espécimes do Grupo III (Dentes hígidos; Controle Negativo), a fim de estabelecer a espessura do ligamento periodontal sadio.

Coloração de Brown e Brenn modificada

Os cortes foram corados pela Técnica adaptada de Brown e Brenn (1931), modificada por Taylor, em 1966. Os cortes foram desparafinizados (3 banhos de xilol de 8 minutos cada), hidratados (banhos com alcoóis a 100, 95 e 80%), lavados em água corrente por cerca de 3 minutos e colocados em um recipiente com água destilada. A solução de violeta cristal tamponada com bicarbonato de sódio a 5% foi aplicada sobre os cortes por 30 segundos e, em seguida, as lâminas foram lavadas com água destilada. A seguir, as lâminas foram mergulhadas em solução de iodo de Gram por 30 segundos e lavadas com água destilada. Após a remoção do excesso de água destilada com papel absorvente, as lâminas passaram por uma solução de éter-acetona (proporção 1:1) para remoção do excesso de corantes e foram novamente lavadas com água destilada. As lâminas foram então colocadas em fucsina básica, durante 30 segundos, lavadas com água destilada, colocadas em ácido pícrico aquoso, por 1 minuto, lavadas e secas com papel absorvente. A seguir, as lâminas foram mergulhadas em solução de acetona P.A., para remoção do excesso de corantes, e em solução de acetona-xilol. A seguir, as lâminas passaram por 3 banhos de xilol de 3 minutos cada, com posterior montagem das lâminas com lamínula e Entellan.

Essa coloração foi realizada com 3 objetivos principais: avaliar a presença ou ausência de bactérias; avaliar a localização das bactérias; e avaliar a intensidade da contaminação bacteriana.

A presença ou ausência de bactérias e sua localização na coroa dental, no sistema de canais radiculares e na lesão periapical foi avaliada atribuindo-se escores de 0 a 5 (De Rossi, 2008; da Silva et al., 2012; Bezerra da Silva et al., 2014; De Oliveira et al., 2015), como descrito a seguir:

- Ausência de bactérias: escore 0.
- Presença de bactérias na coroa dental: escore 1.
- Presença de bactérias no terço cervical do canal radicular: escore 2.
- Presença de bactérias no terço médio do canal radicular: escore 3.
- Presença de bactérias no terço apical do canal radicular: escore 4.
- Presença de bactérias na lesão periapical: escore 5.

A concentração/intensidade da contaminação bacteriana nos tecidos apicais e periapicais foi avaliada subjetivamente, de acordo com os escores ilustrados na Tabela 2 e 3, respectivamente.

Tabela 2 - Representação dos escores atribuídos à concentração/intensidade da contaminação microbiana nos tecidos apicais, por meio da coloração Brown e Brenn modificada

Representação esquemática	Concentração/Intensidade	Escore
Ausente	0
Suave presença de bactérias na região apical	1
Intensa presença de bactérias na região apical	2
Intensa presença de bactérias sob a forma de biofilme e/ou aglomerados na região apical	3

Tabela 3 - Representação dos escores atribuídos à concentração/intensidade da contaminação microbiana nos tecidos periapicais, por meio da coloração Brown e Brenn modificada

Representação esquemática	Concentração/Intensidade	Escore
Ausente	0
Suave presença de bactérias na região periapical	1
Intensa presença de bactérias na região periapical	2
Intensa presença de bactérias região periapical, sob a forma de aglomerado	3

Histoenzimologia para Fosfatase Ácida Resistente ao Tartarato (TRAP)

A atividade da TRAP foi utilizada para a marcação de osteoclastos (Burstone, 1959; Silva et al., 2012; De Oliveira et al., 2015). Os cortes foram desparafinizados (2 banhos de xilol de 5 minutos cada) e hidratados (álcool 100% por 4 minutos; alcoóis 95, 80 e 50% por 2 minutos cada e água destilada pelo mesmo período). A seguir, as lâminas foram colocadas em solução de álcool/acetona a 50% durante 1 minuto e então os cortes foram secos à temperatura ambiente. Em seguida, a solução contendo 10mL de tampão de ácido acético, 0,1 mL de dimetilformamida, 5mg de *Fast-red* e 1mg de ácido fosfórico naftol AS-BI (Sigma-Aldrich Corporation, Saint Louis, EUA) foi pipetada sobre os cortes, os quais foram mantidos protegidos da luz em estufa a 37°C por, aproximadamente, 40 minutos.

Após a incubação foi realizada a contra-coloração com *Fast-green* por 3 minutos. A seguir, as lâminas foram montadas e avaliadas no microscópio Axio Imager.M1, sob luz convencional, para contagem do número de células TRAP-positivas (osteoclastos) presentes.

Nos espécimes onde havia a presença de lesão periapical, as células TRAP-positivas foram contadas nas lacunas de reabsorção em contato direto com o osso alveolar ao redor da lesão periapical.

Nos espécimes do Grupo III (Dentes hígidos; Controle Negativo), foi efetuada a contagem de células TRAP-positivas, a fim de estabelecer a quantidade de osteoclastos no ligamento periodontal sadio. Com esse objetivo, foi traçada uma linha perpendicular à raiz, situada 0,5mm acima da abertura apical de cada espécime, delimitando assim a altura máxima utilizada para a contagem de osteoclastos.

No Grupo I (EndoVac[®]), nos espécimes onde ocorreu invaginação de tecido conjuntivo, parcialmente mineralizado, para o interior do canal radicular, a contagem de células TRAP-positivas foi realizada como descrito para o Grupo III.

Para todos os Grupos, a contagem de células TRAP-positivas foi expressa em número de células.

Análise Estatística

Para os valores em escores (análise em HE e coloração de Brown e Brenn), as variáveis categóricas foram expressas como frequências e porcentagens. Para comparação entre os grupos foi utilizado o teste do qui-quadrado. Nos casos de tabela de contingência de 2x2, com valores menores que 5, foi utilizado o teste exato de Fisher. Para as variáveis contínuas, os valores foram expressos como média e desvio padrão. Para a comparação das médias entre os grupos foi utilizado o teste ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey. O nível de significância adotado foi de 5%.

Todas as análises e representações gráficas foram realizadas com o auxílio do Software GraphPad Prism 5.a (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA).

Resultados

RESULTADOS

Análise microscópica das regiões apicais e periapicais

Do total de 60 raízes propostas inicialmente, 52 foram analisadas, tendo em vista a presença de agenesias e perdas durante o processamento histotécnico.

Nos dentes do Grupo I (EndoVac® - 15 raízes), observou-se infiltrado inflamatório misto e difuso na maioria dos casos, variando de suave (53,3%) a moderado (26,7%). A região periapical mostrou acentuada neoformação vascular e processo de reparo avançado, com proliferação fibroblástica. Na região do amplo forame apical, chegando até o terço médio do canal radicular, observou-se a presença de tecido conjuntivo e parcialmente mineralizados de origem periodontal invaginado para o interior do canal radicular em 53,6% dos casos, com densa presença de fibroblastos e de vasos sanguíneos. Em 80% dos espécimes não foi observada reabsorção (dentinária, cementária ou óssea) (Figura 2).

Nos dentes do Grupo II (Irrigação Convencional – 17 raízes), havia infiltrado inflamatório misto e difuso em todos os casos (100%), sendo a maioria (58,8% dos espécimes) de grau moderado. O ligamento periodontal estava severamente aumentado em 82,4% dos espécimes, apresentando áreas de edema e dissociação fibrilar. Em 76,5% havia intensa reabsorção óssea, cementária e dentinária. Em alguns casos não havia cementoblastos na superfície do cimento, com presença frequente de reabsorção radicular não reparada (Figura 3).

Nos dentes do Grupo III (controle negativo – 10 raízes), o tecido pulpar estava intacto com camada odontoblástica íntegra e tecido conjuntivo normal. As regiões apicais e periapicais também estavam íntegras, com ligamento periodontal normal. No osso alveolar havia intensa presença osteoblástica em sua superfície. Não foi observada a presença de células inflamatórias (Figura 4).

Nos dentes do Grupo IV (controle positivo – 10 raízes), nas regiões apicais e periapicais houve presença de intenso infiltrado inflamatório misto e difuso.

O ligamento periodontal apresentou-se severamente aumentado, com intensa dissociação fibrilar e edema. Na superfície cementária, as áreas de reabsorção encontravam-se não reparadas. O osso alveolar estava distante do ápice radicular, indicando reabsorção óssea avançada, com ausência de osteoblastos em sua superfície e com presença frequente de osteoclastos (Figura 5).

Figura 2. Fotomicrografias representativas do Grupos I (EndoVac[®]), evidenciando os eventos microscópicos observados na análise descritiva das regiões apical e periapical, 90 dias após a realização do tratamento endodôntico, em microscopia de luz convencional:

(A) Visão panorâmica da região apical e periapical evidenciando intensa invaginação de tecido conjuntivo para dentro do canal radicular (HE, Zeiss, 5X).

(B) Detalhe da imagem A, onde observa-se parte do tecido invaginado após mineralização (HE, Zeiss, 20X).

(C) Fotomicrografia panorâmica da região apical e periapical evidenciando ligamento periodontal suavemente aumentado (HE, Zeiss, 5X).

(D) Pode-se observar a presença de fibras, vasos e suave presença de células inflamatórias (HE, Zeiss, 10X).

Figura 3. Fotomicrografias representativas do Grupos II (Irrigação Convencional), evidenciando os eventos microscópicos observados na análise descritiva das regiões apical e periapical, 90 dias após a realização do tratamento endodôntico, em microscopia de luz convencional:

- (A)** Visão panorâmica da região apical e periapical evidenciando ligamento periodontal ampliado (HE, Zeiss, 1,25X).
- (B)** Detalhe da imagem A, onde observa-se áreas de tecido mineralizado não reparado e intenso infiltrado inflamatório (HE, Zeiss, 5X).
- (C)** Detalhe da imagem B evidenciando infiltrado inflamatório misto, áreas de edema generalizado e intensa dissociação de fibras (HE, Zeiss, 10X).
- (D)** Detalhe da imagem C evidenciando o osso alveolar com ausência de osteoblastos em sua superfície e presença de osteoclastos (HE, Zeiss, 20X).
- (E)** Maior aumento da imagem A evidenciando o infiltrado inflamatório misto, edema generalizado, intensa dissociação de fibras e ausência de células (HE, Zeiss, 40X).
- (F)** Terço médio do canal radicular evidenciando áreas de reabsorção cementária não reparada com ausência total de cementoblastos (HE, Zeiss, 40X).

Figura 4. Fotomicrografias representativas do Grupos III (Dente hígido – Controle negativo), evidenciando os eventos microscópicos observados na análise descritiva das regiões apical e periapical, 90 dias após a realização do tratamento endodôntico, em microscopia de luz convencional:

Em todas as imagens (A, B, C, D, E e F) observa-se rizogênese incompleta, polpa e camada odontoblástica normais. Ligamento periodontal e osso alveolar íntegros.

(A) (HE, Zeiss, 5X),

(B) (HE, Zeiss, 10X).

(C) (HE, Zeiss, 20X).

(D) (HE, Zeiss, 5X).

(E) (HE, Zeiss, 10X).

(F) (HE, Zeiss, 40X).

Figura 5. Fotomicrografias representativas do Grupos IV (Dente com lesão e sem tratamento – Controle Positivo), evidenciando os eventos microscópicos observados na análise descritiva das regiões apical e periapical, 90 dias após a realização do tratamento endodôntico, em microscopia de luz convencional:

(A) Visão panorâmica da região apical e periapical evidenciando ligamento periodontal severamente aumentado, edema generalizado e infiltrado inflamatório severo (HE, Zeiss, 5X).

(B) Detalhe da imagem A, onde observa-se áreas de reabsorção cementária, células inflamatórias em disposição focal e dissociação fibrilar intensa (HE, Zeiss, 10X).

(C) Detalhe da imagem A evidenciando a disposição focal do infiltrado inflamatório severo (HE, Zeiss, 5X).

(D) Detalhe da imagem C evidenciando o osso alveolar com sua superfície revestida por osteoclastos (HE, Zeiss, 20X).

(E) Maior aumento da imagem D evidenciando a presença osteoclástica (HE, Zeiss, 40X).

(F) Detalhe da figura A evidenciando infiltrado inflamatório intenso, dissociação fibrilar intensa e edema generalizado (HE, Zeiss, 20X).

A Figura 6 apresenta os escores observados nos diferentes grupos, com relação ao infiltrado inflamatório. Entre os Grupos I (EndoVac[®]) e II (Irrigação Convencional), foi observada diferença estatística ($p=0,07$). No entanto, ambos os grupos apresentaram diferença significativa, quando comparados aos controles ($p<0,001$) (Tabela 4).

Figura 6- Infiltrado inflamatório: Representação gráfica dos escores observados nos Grupos I (EndoVac[®] - experimental), II (Irrigação Convencional - experimental), III (Dentes hígidos – controle negativo) e IV (Dente com lesão perapical, sem tratamento – controle positivo).

Tabela 4 - Comparação entre os grupos quanto ao infiltrado inflamatório, ligamento periodontal e reabsorção de tecido mineralizados (cimento, dentina e osso alveolar), após análise microscópica dos cortes corados com hematoxilina e eosina sob luz convencional

Escore	Grupos				p-Valores				
	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV	I x II	I x III	I x IV	II x III	II x IV
Infiltrado Inflamatório									
Ausente	2(13,3%)	0(0%)	10(100%)	0(0%)	0,07	≤0,0001	≤0,0001	≤0,0001	≤0,0001
Suave	8(53,3%)	4(23,6%)	0(0%)	0(0%)					
Moderado	4(26,7%)	10(58,8%)	0(0%)	0(0%)					
Severo	1(6,7%)	3(17,6%)	0(0%)	10(100%)					
Ligamento Periodontal									
Normal	3(20%)	0(0%)	10(100%)	0(0%)	0,02	≤0,0001	0,005	≤0,0001	0,273
Levemente aumentada	2(13,4%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)					
Moderadamente aumentada	5(33,3%)	3(17,6%)	0(0%)	0(0%)					
Severamente aumentada	5(33,3%)	14(82,4%)	0(0%)	10(100%)					
Reabsorção de tecidos mineralizados (cimento, dentina e osso)									
Presente	3(20%)	13(76,5%)	0(0%)	10(100%)	0,003	0,250	≤0,0001	≤0,0001	0,263
Ausente	12(80%)	4(23,5%)	10(100%)	0(0%)					

Grupo I - EndoVac®; Grupo II - Irrigação Convencional; Grupo III - Dente hígido; e Grupo IV - Dente com lesão e sem tratamento.

Ainda com relação aos escores do infiltrado inflamatório, foi efetuada análise dos dados estratificando-se os escores em 2 categorias: ausente/suave e moderado/severo. No Grupo I (EndoVac®), 66,6% dos espécimes apresentaram escores ausente/suave, enquanto que os escores moderado/severo foram atribuídos em apenas 33,4% dos casos. Já no Grupo II (Irrigação Convencional), escores ausente/suave foram observados em 23,6% dos casos, enquanto que 76,4% apresentaram escores moderado/severo. A análise estatística dos dados estratificados permitiu evidenciar que houve diferença ($p=0,03$) entre os Grupos I e II, com relação ao infiltrado inflamatório. Assim, pôde-se verificar que após o uso do EndoVac® o infiltrado inflamatório foi predominantemente ausente/suave, enquanto que na Irrigação Convencional foi moderado/severo. Adicionalmente, a análise estatística dos dados estratificados não evidenciou diferença significativa ($p>0,05$)

entre os Grupos I (EndoVac[®]) e III (dentes hígidos – controle negativo) e entre os que o Grupo II (Irrigação Convencional) e o Grupo IV (dente com lesão, sem tratamento - controle positivo).

Com relação ao ligamento periodontal (Figura 7), foi observada diferença significativa ($p=0,02$) quando comparou-se o Grupo I (EndoVac[®]) com o Grupo II (Irrigação Convencional) (Tabela 4). Quando comparou-se o Grupo I (EndoVac[®]) com os controles, observou-se diferença significativa ($p<0,05$). No entanto, quando comparou-se o Grupo II (Irrigação Convencional) aos controles (Grupos III e IV), não foi observada diferença significativa somente com o Grupo IV (dente com lesão periapical, sem tratamento controle positivo) ($p=0,273$). Esses dados demonstraram que após o uso do EndoVac[®] a espessura do ligamento periodontal foi menor que quando utilizou-se a Irrigação Convencional.

Figura 7- Ligamento periodontal: Representação gráfica dos escores observados nos Grupos I (EndoVac[®] - experimental), II (Irrigação Convencional - experimental), III (Dentes hígidos – controle negativo) e IV (Dente com lesão perapical, sem tratamento – controle positivo).

A Figura 8 apresenta os escores relacionados atribuídos à reabsorção de tecidos mineralizados (cimento, dentina e osso alveolar). Foi observada diferença significativa ($p=0,003$), quando comparou-se os Grupos I (EndoVac[®]) e II (Irrigação Convencional).

Não foi observada diferença significativa quando comparou-se o Grupo I (EndoVac[®]) com o Grupo III (dente hígido – controle negativo) ($p=0,25$). Por outro lado, não se observou diferença entre o Grupo II (Irrigação Convencional) e o Grupo IV (dente com lesão periapical, sem tratamento - controle positivo) ($p=0,263$). A análise global desses dados permitiu verificar que após o uso do EndoVac[®] observou-se menor reabsorção dos tecidos mineralizados que quando utilizou-se a Irrigação Convencional.

Figura 8- Reabsorção de tecidos mineralizados (cimento, dentina e osso alveolar): Representação gráfica dos escores observados nos Grupos I (EndoVac[®] - experimental), II (Irrigação Convencional - experimental), III (Dentes hígidos – controle negativo) e IV (Dente com lesão perapical, sem tratamento – controle positivo).

Morfometria em microscopia de fluorescência

Com relação à análise morfométrica da extensão (área em mm²) das lesões periapicais por meio da microscopia de fluorescência, a média do tamanho das lesões foi de 12,94mm² para o Grupo I (EndoVac®), 17,91mm² para o Grupo II (Irrigação Convencional) e 21,47mm² para o Grupo IV (dente com lesão periapical, sem tratamento - controle positivo). No Grupo III (dente hígido - controle negativo), evidenciou-se área do ligamento periodontal na região apical de 0,67mm² (Tabela 5).

Tabela 5 – Resultados da análise morfométrica da extensão das lesões periapicais, em mm², em microscopia de fluorescência, nos espécimes nos Grupos I (EndoVac® - experimental), II (Irrigação Convencional - experimental), III (Dentes hígidos – controle negativo) e IV (Dente com lesão perapical, sem tratamento – controle positivo)

Grupo I - EndoVac®; Grupo II - Irrigação Convencional; Grupo III - Dentes hígidos; e Grupo IV - Dente com lesão perapical.

	Mínima	Máxima	Média	Desvio Padrão
Grupo I	0,86	26,37	12,94	7,73
Grupo II	6,78	35,52	17,91	8,85
Grupo III	0,29	1,64	0,67	0,38
Grupo IV	20,16	23,59	21,47	1,48

Os menores valores numéricos de área foram observados nos Grupos I (média de 12,94mm²) e III (média de 0,67mm²), enquanto que os maiores valores numéricos foram observados nos Grupos II (média de 17,91mm²) e IV (média de 21,47mm²). Quando realizou-se a comparação entre o Grupos I (EndoVac®) e II (Irrigação Convencional) não foi observada diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$). A comparação com os controles evidenciou que ambos os grupos (I e II) apresentaram diferença significativa apenas quando comparados ao Grupo III (dentes hígidos – controle negativo) (Figura 10).

Figura 10 – Boxplot da comparação da extensão das lesões periapicais por meio de microscopia de fluorescência, entre os Grupos I (EndoVac® - experimental), II (Irrigação Convencional - experimental), III (Dentes hígidos – controle negativo) e IV (Dente com lesão perapical, sem tratamento – controle positivo). As letras diferentes representam grupos com diferença estatística ($p > 0,05$).

A Figura 9 apresenta imagens representativas dos Grupos I a IV, obtidas após coloração de HE sob microscopia de fluorescência.

Figura 9. Fotomicrografias dos cortes microscópicos representativos dos 4 grupos, 90 dias após a realização do tratamento endodôntico, corados com hematoxilina e eosina observadas em microscopia de fluorescência.

(A) Fotomicrografia representativa do Grupo IV (Dente com lesão periapical e sem tratamento – Controle Positivo) (HE, Zeiss, 1,25X).

(B) Fotomicrografia representativa do Grupo III (Dente hígido – Controle Negativo) (Zeiss, 40X).

(C) Fotomicrografia representativa do Grupo II (Irrigação Convencional) (HE, Zeiss, 1,25X).

(D) Fotomicrografia representativa do Grupo II (Irrigação Convencional) (HE, Zeiss, 1,25X).

(E) Fotomicrografia representativa do Grupo I (EndoVac[®]) (HE, Zeiss, 1,25X).

(F) Fotomicrografia representativa do Grupo I (EndoVac[®]) (HE, Zeiss, 1,25X).

Coloração de Brown e Brenn

Quanto à presença e localização bacteriana (Tabela 6), nos espécimes do Grupo I (EndoVac®) observou-se grande acúmulo de bactérias nos túbulos dentinários, no cimento e nas lacunas de reabsorção do terço radicular apical, em 35,7% dos casos. Um total de 64,3% dos espécimes apresentaram, também, bactérias na lesão periapical.

Nos Grupos II (Irrigação Convencional) e IV (dentes com lesão periapical, sem tratamento) foram detectadas bactérias nos túbulos dentinários, no cimento e nas lacunas de reabsorção do terço radicular apical, em 100% dos casos. No entanto, houve presença bacteriana na lesão periapical nos Grupos II e IV, em 88,2% e em 100% dos casos, respectivamente.

Nos espécimes do Grupo III (dentes hígidos) não foi observada presença de bactérias.

Tabela 6 - Comparação entre os grupos quanto aos escores atribuídos à presença ou ausência de bactérias e sua localização na coroa dental, no sistema de canais radiculares e na lesão periapical

Escore	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV	p-Valor				
					I x II	I x III	I x IV	II x III	II x IV
0	0(0%)	0(0%)	10(100%)	0(0%)	0,085	≤0,0001	0,159	≤0,0001	0,529
1	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)					
2	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)					
3	0(0%)	1(5,9%)	0(0%)	0(0%)					
4	5(35,7%)	1(5,9%)	0(0%)	0(0%)					
5	9(64,3%)	15(88,2%)	0(0%)	4(100%)					

Escore 0: ausência de bactérias; Escore 1: presença de bactérias na coroa dental; Escore 2: presença de bactérias no terço cervical do canal radicular; Escore 3: presença de bactérias no terço médio do canal radicular; Escore 4: presença de bactérias no terço apical do canal radicular; e Escore 5: presença de bactérias na lesão periapical.

Quanto à avaliação do grau de concentração/intensidade das bactérias nos tecidos apicais, constatou-se que no Grupo I (EndoVac®) a presença de bactérias era suave em 50% dos casos. Nos tecidos periapicais, houve suave presença bacteriana em 64,3% dos espécimes (Tabelas 7 e 8).

Já no Grupo II (Irrigação Convencional), em 35,3% dos casos a presença de bactérias nos tecidos apicais foi suave e, em 47,0% foi observada intensa presença de bactérias sob forma de biofilme e/ou aglomerados. Ao observar-se os tecidos periapicais, 76,4% apresentaram suave presença bacteriana. No entanto, 11,8% dos espécimes apresentaram intensa presença de bactérias na região periapical (Tabelas 7 e 8).

Os espécimes do Grupo IV apresentaram intensa contaminação bacteriana no ápice, em 75% dos casos, além de suave presença de bactérias na região periapical, em 100% dos casos.

Quando os escores da presença/ausência, localização e concentração/intensidade da contaminação bacteriana nos Grupo I (EndoVac®) e II (Irrigação Convencional) foram comparados, não foi observada diferença significativa ($p>0,05$). Quando esses 2 grupos foram comparados aos controles, observou-se diferença significativa apenas com o Grupo III (dentes hígidos) ($p<0,05$).

Tabela 7 - Comparação entre os grupos quanto à concentração/intensidade das bactérias nos tecidos apicais

Escore	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV	p-Valor				
					I X II	I X III	I X IV	II X III	II X IV
0	0(0%)	1(5,9%)	10(100%)	0(0%)	0,683	≤0,0001	0,192	≤0,0001	0,470
1	7(50%)	6(35,3%)	0(0%)	0(0%)					
2	2(14,3%)	2(11,8%)	0(0%)	1(25%)					
3	5(35,7%)	8(47,0%)	0(0%)	3(75%)					

Escore 0 – Ausente; Escore 1 - Suave presença de bactérias na região apical; Escore 2 - Intensa presença de bactérias na região apical e Escore 3 - Intensa presença de bactérias sob a forma de biofilme e/ou aglomerados na região apical.

Tabela 8 - Comparação entre os grupos quanto à concentração/intensidade das bactérias nos tecidos periapicais

Escore	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV	p-Valor				
					I X II	I X III	I X IV	II X III	II X IV
0	5(35,7%)	2(11,8%)	10(100%)	0(0%)	0,152	0,002	0,277	≤0,0001	0,559
1	9(64,3%)	13(76,4%)	0(0%)	4(100%)					
2	0(0%)	2(11,8%)	0(0%)	0(0%)					
3	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)					

Escore 0 – Ausente; Escore 1 - Suave presença de bactérias na região periapical; Escore 2 - Intensa presença de bactérias na região periapical e Escore 3 - Intensa presença de bactérias sob a forma de biofilme e/ou aglomerados na região periapical.

A Figura 11 apresenta imagens representativas dos Grupos I a IV, obtidas após a coloração de Brown e Brenn.

Figura 11. Fotomicrografias representativas dos cortes microscópicos dos 4 grupos avaliados corados com a técnica de Brown e Brenn, evidenciando a presença e a localização bacteriana no sistema de canais radiculares e nos tecidos periapicais e a concentração/intensidade bacteriana, 90 dias após a realização do tratamento endodôntico:

(A) Fotomicrografia representativa do Grupo IV (Controle Positivo), demonstrando contaminação microbiana na área apical (Zeiss, 20X).

(B) Fotomicrografia representativa do Grupo III (Controle Negativo), demonstrando tecidos apicais e periapicais saudáveis (Zeiss, 10X).

(C) Fotomicrografia representativa do Grupo I (EndoVac®), demonstrando presença bacteriana no interior dos túbulos dentinários (Zeiss, 40X).

(D) Fotomicrografia representativa do Grupo II (Irrigação Convencional), demonstrando intensa presença bacteriana na região periapical (Zeiss, 40X).

Histoenzimologia para a atividade da fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP)

Com relação ao número de células TRAP-Positivas (osteoclastos), a média do Grupo I (EndoVac[®]) foi de 26,25, do Grupo II (Irrigação Convencional) 50,94, do Grupo III (Controle Negativo) 7,9 e do Grupo IV (Controle Positivo) foi de 103 células. Assim, os menores valores numéricos foram observados nos Grupos I e III, enquanto que os maiores valores numéricos foram observados nos Grupos II e IV (Tabela 9).

Tabela 9 – Resultados da contagem do número de osteoclastos, nos espécimes nos Grupos I (EndoVac[®] - experimental), II (Irrigação Convencional - experimental), III (Dentes hígidos – controle negativo) e IV (Dente com lesão perapical, sem tratamento – controle positivo)

	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão
Grupo I	3	58	26,25	18,78
Grupo II	14	98	50,94	26,74
Grupo III	2	19	9,16	4,99
Grupo IV	81	131	103	23,27

Quando realizou-se a comparação entre o Grupos I (EndoVac[®]) e II (Irrigação Convencional) foi observada diferença significativa ($p < 0,0001$), com menos números de osteoclastos para o Grupo I. A comparação com os controles evidenciou que não houve diferença significativa apenas quando comparou-se os Grupos I e III ($p < 0,05$)(Figura 12).

Figura 12- Boxplot da comparação das médias da contagem do número de osteoclastos, entre os Grupos I (EndoVac® - experimental), II (Irrigação Convencional - experimental), III (Dentes hígidos – controle negativo) e IV (Dente com lesão perapical, sem tratamento – controle positivo). As letras diferentes representam grupos com diferença estatística ($p > 0,05$).

A Figura 13 apresenta imagens representativas dos Grupos I a IV, obtidas após a realização da histoenzimologia para a atividade da fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP), para a contagem dos osteoclastos.

Figura 13. Fotomicrografias dos cortes microscópicos representativos dos 4 grupos avaliados, 90 dias após a realização do tratamento endodôntico, corados por meio da técnica de histoenzimologia para a atividade da fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) para identificação e contagem de células osteoclásticas:

- (A)** Fotomicrografia panorâmica da região apical e periapical representativa do Grupo IV (Dente com lesão periapical e sem tratamento – Controle Positivo), onde observa-se a ápice radicular e osso alveolar com presença de osteoclastos (Zeiss, 5X).
- (B)** Detalhe da Imagem A evidenciando presença frequente de osteoclastos (Zeiss, 20X).
- (C)** Fotomicrografia panorâmica da região apical e periapical representativa do Grupo III (Dente hígido – Controle Negativo), onde observa-se tecidos saudáveis (Zeiss, 5X).
- (D)** Fotomicrografia representativa do Grupo II (Irrigação Convencional) em detalhe da superfície do osso alveolar (Zeiss, 40X).
- (E)** Fotomicrografia panorâmica da região apical e periapical representativa do Grupo I (EndoVac[®]) (Zeiss, 5X).
- (F)** Detalhe da imagem E evidenciando os osteoclastos na superfície óssea (Zeiss, 40X).

Discussão

DISCUSSÃO

Além de facilitar a instrumentação (Basrani, 2011), as soluções irrigadoras são utilizadas durante o tratamento endodôntico com o objetivo de dissolver o tecido pulpar, remover resíduos orgânicos e *smear layer*, além de favorecer a diminuição da contaminação microbiana localizada na luz dos canais radiculares (Abou-Rass e Piccinino, 1982; Lee et al., 2004; Haapasalo et al., 2010; van der Sluis et al., 2006; Townsend e Maki, 2009). Com essa finalidade, o hipoclorito de sódio tem sido amplamente utilizado (Jena et al., 2015), em concentrações variando entre 0,5 a 6% (Hülsmann e Hahn, 2000; Zehnder, 2006), em função da sua capacidade de limpeza (Naenni et al., 2004) e desorganização do biofilme (Clegg et al., 2006). No entanto, em altas concentrações, o hipoclorito de sódio pode ocasionar agressão tecidual (de Sermeño et al., 2009), uma vez que, quando em contato com tecidos vivos, pode provocar ulceração, inibição da migração de neutrófilos, alterações em células endoteliais e fibroblastos (Gernhardt et al., 2004) e edema (de Sermeño et al., 2009). Por essa razão, a extrusão inadvertida da solução irrigadora para os tecidos apicais e periapicais, principalmente em concentrações mais elevadas, é indesejada, justificando a relevância clínica do desenvolvimento de técnicas que diminuam a extrusão de solução irrigadora para os tecidos periapicais.

Assim, o presente trabalho *in vivo* teve como objetivo avaliar a resposta tecidual de dentes de cães com lesão periapical e rizogênese incompleta, ou seja, com ápices abertos, após irrigação pela técnica convencional (pressão positiva) e com o uso do sistema EndoVac®. Em estudos *in vitro*, esse sistema tem demonstrado ser capaz de diminuir ou mesmo evitar a extrusão de solução irrigadora além do forame apical (Fukumoto et al., 2006; Desai e Himel, 2009; Mitchell et al., 2011; Íriboz et al., 2015) e favorecer a remoção de debris, inclusive em dentes com rizogênese incompleta (Parente et al., 2010).

Apesar da grande maioria dos estudos que avaliaram o sistema EndoVac® terem sido realizados *in vitro* (Parente et al., 2010; Mitchell et al., 2011; Malentacca et al., 2012; Adorno et al., 2015; Íriboz et al., 2015), a irrigação com pressão apical negativa com o uso do EndoVac® poderia promover, *in vivo*, menor

extravasamento de agente irrigante para o periápice e permitir melhor limpeza no terço apical, ocasionando resposta inflamatória de menor magnitude. Assim, o presente estudo foi delineado *in vivo*, empregando cães como modelo experimental, pois esses animais apresentam reparo apical e periapical semelhante ao humano, além de apresentarem uma elevada taxa de crescimento, que permite obter resultados em menor período de tempo (Citrome et al., 1979).

Ainda, a resposta ideal dos tecidos apicais e periapicais após o tratamento endodôntico de dentes com lesão periapical, deve incluir ausência de alterações no ligamento periodontal, no cemento e no osso alveolar, com deposição de tecido mineralizado em nível apical, ou seja, formação do selamento biológico (Leonardo et al., 1993; Leonardo et al., 2003; Silva et al., 2010). Para avaliar esses aspectos, realizamos análises histopatológicas, histomicrobiológicas e histoenzimológicas.

No presente estudo a análise microscópica da resposta inflamatória e do processo de reparo da região periapical evidenciou diferenças marcantes entre o EndoVac® e a irrigação convencional. Nos espécimes onde o EndoVac® foi utilizado, após 90 dias o infiltrado inflamatório foi predominantemente ausente/suave, enquanto que quando a irrigação convencional foi utilizada o infiltrado foi predominantemente moderado/severo. Além disso, a espessura do ligamento periodontal, a reabsorção de tecidos mineralizados e o número de osteoclastos foram menores após o uso do EndoVac®, em comparação à irrigação convencional.

Deve-se salientar que a resposta ideal pós-tratamento endodôntico seria a invaginação de tecido conjuntivo pulpar para o interior do canal radicular. No entanto, no presente estudo observou-se invaginação de tecido conjuntivo parcialmente mineralizado em 53,6% dos canais radiculares, 90 dias após o uso do EndoVac®, em dentes com rizogênese incompleta e lesão periapical induzida. A invaginação de tecido conjuntivo periodontal sadio para o interior do canal radicular, na região apical, indica que a intensa contaminação microbiana foi controlada.

Assim, a análise global dos resultados dos parâmetros microscópicos avaliados (infiltrado inflamatório, espessura do ligamento periodontal e reabsorção

de tecidos mineralizados), no presente estudo, permitiu verificar que, de modo geral, os espécimes tratados com EndoVac[®] se comportaram de maneira semelhante aos espécimes do Grupo III (dente hígido – controle negativo), enquanto que o grupo tratado com a irrigação convencional, se comportou de maneira semelhante ao Grupo IV (dente com lesão e sem tratamento – controle positivo).

Na literatura específica, apenas 2 trabalhos publicados por Silva et al. (2010) e Cohenca et al. (2015) avaliaram a resposta microscópica *in vivo*, em dentes de cães, após o uso do EndoVac[®].

Silva et al., (2010) compararam a revascularização e o processo de reparo apical e periapical em dentes de cães com rizogênese incompleta e lesão periapical, após o uso do EndoVac[®], em comparação à associação irrigação convencional/uso do curativo com a pasta poliantibiótica Trimix. Embora tenha sido observada diferença significativa apenas com relação ao infiltrado inflamatório, os casos tratados com o EndoVac[®] apresentaram exuberantes formações de tecido mineralizado em nível apical, tecido conjuntivo da região apical e periapical mais estruturado e processo de reparo em estágio mais avançado. Concluíram que o sistema EndoVac[®] pode ser considerado como um protocolo de desinfecção promissor em dentes com rizogênese incompleta e lesão periapical, e que o uso de antibióticos intracanal é desnecessário. Os resultados do presente estudo são concordantes com os obtidos por Silva et al. (2010), nos espécimes onde o EndoVac[®] foi utilizado, observando-se tecido conjuntivo bem estruturado, intensa vascularização e processo de reparo avançado.

Além do efeito na redução da contaminação microbiana intracanal (Hockett et al., 2008; Cohenca et al., 2010; Miller e Baumgartner, 2010; Cohenca et al., 2013; Miranda et al., 2013) e na redução da extrusão de solução irrigadora para o ápice (Fukumoto et al., 2006; Desai e Himel, 2009; Mitchell et al., 2011; Íriboz et al., 2015), outro fator que poderia explicar os melhores resultados após o uso do EndoVac[®] seria o efeito “vapor lock”. Segundo Schoeffel (2008), a pressão negativa do sistema EndoVac[®] gera um fluxo invertido de solução irrigadora, eliminando bolhas de ar, formadas normalmente em sistemas fechados. Esta eliminação é importante, pois as bolhas poderiam se unir na região apical, originando o efeito

conhecido como “vapor lock”, o qual impede o contato da solução irrigadora com as áreas de interesse. O sistema de irrigação por pressão apical negativa (EndoVac®) favorece o posicionamento das pontas de aspiração próximas ao limite do comprimento de trabalho, ocasionando a eliminação das bolhas e facilitando a ação da solução irrigadora (Schoeffel, 2008). Sendo assim, o sistema auxilia na limpeza dos canais radiculares, favorecendo o reparo tecidual.

Em 2015, Cohenca et al., empregando dentes de cães com rizogênese completa e lesão periapical, compararam a irrigação com EndoVac® à irrigação convencional e ultra-sônica. Os resultados da análise microscópica demonstraram que houve diferença significativa apenas no infiltrado inflamatório, que apresentou-se mais suave nos espécimes onde o EndoVac® foi utilizado, em comparação à irrigação convencional. Não foram observadas diferenças significantes com relação à espessura do ligamento periodontal, reabsorção de tecidos mineralizados, tamanho da lesão periapical e número de osteoclastos. Esses resultados são discordantes dos obtidos no presente estudo, possivelmente em função das características peculiares dos dentes com rizogênese incompleta, os quais apresentam maior aporte vascular (Webber, 1984; Patel e Cohenca, 2006), possibilitando a ocorrência do processo de reparo em um período de tempo mais reduzido.

No presente estudo, foi realizada também a avaliação da presença ou ausência de bactérias, sua localização e a intensidade da contaminação bacteriana pela técnica de Brown e Brenn. Não foi observada diferença estatística entre o uso do EndoVac® e da Irrigação Convencional em nenhum dos parâmetros analisados, pois em ambos os tipos de irrigação, apesar da ausência de bactérias na luz do canal principal, foi observada contaminação bacteriana difusa nos túbulos dentinários, cemento e, inclusive, na lesão periapical. Embora estudos *in vitro* (Hockett et al., 2008; Miller e Baumgartner, 2010; Miranda et al., 2013) e *in vivo* (Pawar et al., 2012) tenham demonstrado maior redução na quantidade de micro-organismos na luz do canal radicular após o uso do EndoVac® em comparação à irrigação convencional, os resultados do presente estudo evidenciaram que, apesar da ausência de bactérias na luz do canal, as bactérias continuavam presentes no restante do sistema de canais radiculares, ou seja, nos túbulos dentinários, crateras cementárias e na lesão periapical, em ambos os tipos de irrigação. Esses resultados

evidenciam que, apesar do preparo biomecânico e da irrigação pelo método convencional (pressão positiva) ou pelo método de pressão apical negativa auxiliarem na redução da contaminação microbiana do sistema de canais radiculares, a fim de ocasionar redução adicional da contaminação microbiana o curativo de demora entre sessões é indispensável nos dentes com lesão periapical, a fim de elevar a porcentagem de sucesso pós-tratamento endodôntico, como já salientado por outros autores (De Rossi et al., 2005; Leonardo et al., 2006; Sathorn et al., 2009).

Com relação aos resultados da mensuração da área das lesões periapicais realizada no presente estudo, em microscopia de fluorescência pós-irrigação, não foi observada diferença entre as áreas das lesões dos Grupos I (EndoVac[®]) e II (Irrigação Convencional). Apesar da análise histopatológica nos cortes corados por HE ter evidenciado reparo tecidual em estágio avançado nos espécimes do Grupo EndoVac[®], as lesões periapicais desse grupo que não sofreram reparação completa apresentaram áreas extensas. Esse fato pode explicar a ausência de diferença significativa entre as áreas das lesões dos Grupos I e II, quando observadas sob microscopia de fluorescência.

Adicionalmente, sabe-se que o tecido ósseo é dinâmico e sofre constante remodelação e, em condições patológicas, como nos casos de lesões periapicais crônicas, quando há perda óssea o processo de reabsorção é superior à formação óssea. Um dos achados característicos dessa condição é o acúmulo de osteoclastos nas áreas de reabsorção óssea (Walsh et al., 2006). No presente estudo foi possível observar diferença significativa na quantidade de osteoclastos entre os 2 tipos de irrigação avaliados. A média do número de células TRAP-positivas após utilização do EndoVac[®] foi menor, em comparação à irrigação convencional. Esses resultados são discordantes dos obtidos por Cohenca et al. (2015), que não observaram diferenças no número de osteoclastos, após o uso do EndoVac[®] e da irrigação convencional, possivelmente pelo fato desse autores terem utilizado, como modelo experimental, dentes com ápices completos.

Finalizando, os resultados observados no presente estudo *in vivo*, nas diferentes metodologias empregadas, permitiram verificar que a irrigação com

pressão apical negativa, por meio do uso do EndoVac[®], apresenta vantagens com relação à irrigação convencional. Estudos comparativos adicionais são necessários, inclusive em nível clínico, a fim de fornecer subsídios adicionais para a indicação clínica da melhor forma de irrigação.

Conclusão

CONCLUSÃO

Com base nas metodologias empregadas e nos resultados obtidos, pudemos concluir que a irrigação por pressão apical negativa (EndoVac[®]) apresentou melhores resultados biológicos, quando comparada à irrigação convencional, favorecendo a ocorrência do processo de reparo em dentes com rizogênese incompleta e lesão periapical.

Referências

REFERÊNCIAS

- Abarajithan M, Dham S, Velmurugan N, Valerian-Albuquerque D, Ballal S, Senthilkumar H. Comparison of Endovac irrigation system with conventional irrigation for removal of intracanal smear layer: an in vitro study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2011 Sep;112(3):407-11.
- Abou-Rass M, Piccinino MV. The effectiveness of four clinical irrigation methods on the removal of root canal debris. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1982.54:323-328.
- Adorno CG, Fretes VR, Ortiz CP, Mereles R, Sosa V, Yubero MF, Escobar PM, Heilborn C. Comparison of two negative pressure systems and syringe irrigation for root canal irrigation: an ex vivo study. *Int Endod J.* 2015 Jan 29.
- Aksel H, Askerbeyli S, Canbazoglu C, Serper A. Effect of needle insertion depth and apical diameter on irrigant extrusion in simulated immature permanent teeth. *Braz Oral Res.* 2014 Jan-Feb;28(1):1-6.
- Alkahtani A, Al Khudhairi TD, Anil S. A comparative study of the debridement efficacy and apical extrusion of dynamic and passive root canal irrigation systems. *BMC Oral Health.* 2014 Feb 11;14:12.
- American Academy of Pediatric Dentistry (AAPD). Guideline on pulp therapy for primary and immature permanent teeth. Reference Manual. 36(6):242-50, 2014/2015.
- Assed, S. *Odontopediatria : bases científicas para a prática clínica / Sada Assed.*-São Paulo: Artes Médicas, 2005.
- Basrani B. Irrigation in endodontic treatment. *Alpha Omegan.* 2011 Spring;104(1-2):18-25.
- Bezerra da Silva RA, Nelson-Filho P, Lucisano MP, De Rossi A, de Queiroz AM, Bezerra da Silva LA. MyD88 knockout mice develop initial enlarged periapical lesions with increased numbers of neutrophils. *Int Endod J.* 2014 Jul;47(7):675-86.
- Boutsioukis C, Lambrianidis T, Kastrinakis E. Irrigant flow within a prepared root canal using various flow rates: a Computational Fluid Dynamics study. *Int Endod J.* 2009 Feb;42(2):144-55.
- Bronnec F, Bouillaguet S, Machtou P. Ex vivo assessment of irrigant penetration and renewal during the final irrigation regimen. *Int Endod J.* 2010 Aug;43(8):663-72.
- Burstone MS. Histochemical demonstration of acid phosphatase activity in osteoclasts. *J Histochem Cytochem* 1959;7: 39–41.
- Byström A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. *Scand J Dent Res.* 1981 Aug;89(4):321-8.
- Citrome GP, Kaminski EJ, Heuer MA. A comparative study of tooth apexification in the dog. *J Endod.* 1979 Oct;5(10):290-7.
- Clegg MS, Vertucci FJ, Walker C, Belanger M, Britto LR. The effect of exposure to irrigant solutions on apical dentin biofilms in vitro. *J Endod.* 2006 May;32(5):434-7.
- Cohenca N, Heilborn C, Johnson JD, Flores DS, Ito IY, da Silva LA. Apical negative pressure

irrigation versus conventional irrigation plus triantibiotic intracanal dressing on root canal disinfection in dog teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010 Jan;109(1):e42-6.

Cohenca N, Romualdo PC, da Silva LA, da Silva RA, de Queiroz AM, De Rossi A, Nelson-Filho P. Tissue response to root canal irrigation systems in dogs' teeth with apical periodontitis. *Clin Oral Investig.* 2015 Jun;19(5):1147-56.

Cohenca N, Silva LA, Silva RA, Nelson-Filho P, Heilborn C, Watanabe E, Saraiva MC. Microbiological evaluation of different irrigation protocols on root canal disinfection in teeth with apical periodontitis: an in vivo study. *Braz Dent J.* 2013 Sep-Oct;24(5):467-73.

da Silva RA, Ferreira PD, De Rossi A, Nelson-Filho P, Silva LA. Toll-like receptor 2 knockout mice showed increased periapical lesion size and osteoclast number. *J Endod.* 2012 Jun;38(6):803-13.

de Oliveira KM, da Silva RA, De Rossi A, Fukada SY, Feres M, Nelson-Filho P, da Silva LA. Absence of interleukin 22 affects the oral microbiota and the progression of induced periapical lesions in murine teeth. *Int Endod J.* 2015 Jan;48(1):46-59.

De Rossi A, Rocha LB, Rossi MA. Interferon-gamma, interleukin-10, Intercellular adhesion molecule-1, and chemokine receptor 5, but not interleukin-4, attenuate the development of periapical lesions. *J Endod.* 2008 Jan;34(1):31-8.

De Rossi A, Silva LA, Leonardo MR, Rocha LB, Rossi MA. Effect of rotary or manual instrumentation with or without a calcium hydroxide/1% chlorhexidine intracanal dressing on the healing of experimentally induced chronic periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005;99:628-36.

de Sermeño RF, da Silva LA, Herrera H, Herrera H, Silva RA, Leonardo MR. Tissue damage after sodium hypochlorite extrusion during root canal treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009 Jul;108(1):e46-9.

Desai P, Himel V. Comparative safety of various intracanal irrigation systems. *J Endod* 2009;35:545-9.

Desai SV, Love RM, Rich AM, Seymour GJ. Toll-like receptor 2 expression in refractory periapical lesions. *Int Endod J.* 2011;44(10):907-16.

Druttman ACS, Stock CRJ. An in vitro comparison of ultrasonic and conventional methods of irrigant replacement. *Int Endod J.* 1989.22: 174-8.

Dua A, Dua D. Comparative evaluation of efficacy of EndoVac irrigation system to Max-I probe in removing smear layer in apical 1 mm and 3 mm of root canal: An in vitro scanning electron microscope study. *Dent Res J (Isfahan).* 2015 Jan-Feb;12(1):38-43

Fukumoto Y, Kikuchi I, Yoshioka T, Kobayashi C, Suda H. An ex vivo evaluation of a new root canal irrigation technique with intracanal aspiration. *Int Endod J.* 2006 Feb;39(2):93-9.

Gade VJ, Sedani SK, Lokade JS, Belsare LD, Gade JR. Comparative evaluation of debris removal from root canal wall by using EndoVac and conventional needle irrigation: An in vitro study. *Contemp Clin Dent.* 2013 Oct;4(4):432-6.

Gernhardt CR, Eppendorf K, Kozlowski A, Brandt M. Toxicity of concentrated sodiumhypochlorite used as an endodontic irrigant. *Int Endod J.* 2004 Apr;37(4):272-80.

- Haapasalo M, Shen Y, Qian W, Gao Y. Irrigation in endodontics. *Dent Clin North Am*. 2010 Apr;54(2):291-312. doi: 10.1016/j.cden.2009.12.001. Review.
- Hockett JL, Dommisch JK, Johnson JD, Cohenca N. Antimicrobial efficacy of two irrigation techniques in tapered and nontapered canal preparations: an in vitro study. *J Endod*. 2008 Nov;34(11):1374-7.
- Hülsmann M, Hahn W. Complications during root canal irrigation—literature review and case reports. *Int Endod J*. 2000 May;33(3):186-93. Review.
- 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 Mar;41(3):3804.
- Ito IY, Matoba Junior F, Paula-Silva FW, Da Silva LA, Leonardo MR, Nelson-Filho P. Microbial culture and checkerboard DNA-DNA hybridization assessment of bacteria in root canals of primary teeth pre- and post-endodontic therapy with a calcium hydroxide/chlorhexidine paste. *Int J Paediatr Dent*. 2011;21:353-60.
- Jena A, Sahoo SK, Govind S. Root canal irrigants: a review of their interactions, benefits, and limitations. *Compend Contin Educ Dent*. 2015 Apr;36(4):256-261;quiz262.
- Jiang J, Zuo J, Chen SH, Holiday LS. Calcium hydroxide reduces lipopolysaccharide-stimulated osteoclast formation. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, v95, p.348-354, 2003.
- Kara Tuncer A, Unal B. Comparison of sealer penetration using the EndoVac irrigation system and conventional needle root canal irrigation. *J Endod*. 2014 May;40(5):613-7.
- Kawashima N, Wadachi R, Suda H, Yeng T, Parashos P. Root canal medicaments. *Int Dent J*. 2009 Feb;59(1):5-11. Review.
- Kwang S, Abbott P. The presence and distribution of bacteria in dentinal tubules of root filled teeth. *Int Endod J*. 2014 Jun;47(6):600-10.
- L.W. van der Sluis, G. Gambarini, M.K. Wu, P.R. Wesselink. The influence of volume, type of irrigant and flushing method on removing artificially placed dentine debris from the apical root canal during passive ultrasonic irrigation. *Int Endod J*, 39 (2006), pp. 472–476.
- Lee SJ, Wu MK, Wesselink PR. The effectiveness of syringe irrigation and ultrasonics to remove debris from simulated irregularities within prepared root canal walls. *Int Endod J*. 2004 Oct;37(10):672-8.
- Leonardo MR, Hernandez ME, Silva LA, Tanomaru-Filho M. Effect of a calcium hydroxide based root canal dressing on periapical repair in dogs: a histological study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006 Nov;102(5):680-5.
- Leonardo MR, Rossi MA, Silva LA, Ito IY, Bonifácio KC. EM evaluation of bacterial biofilm and microorganisms on the apical external root surface of human teeth. *J Endod*. 2002 Dec;28(12):815-8.
- Leonardo MR, Salgado AA, da Silva LA, Tanomaru Filho M. Apical and periapical repair of dogs' teeth with periapical lesions after endodontic treatment with different root canal sealers. *Pesqui Odontol Bras*. 2003 Jan-Mar;17(1):69-74.

Leonardo MR, Silva LA, Leonardo RT, Utrilla LS, Assed S. Histological evaluation of therapy using a calcium hydroxide dressing for teeth with incompletely formed apices and periapical lesions. *J Endod*. 1993;19:348-52.

Leonardo MR. *Endodontia: tratamento de canais radiculares*. São Paulo: Artes Médicas; 2005.

Malentacca A, Uccioli U, Zangari D, Lajolo C, Fabiani C. Efficacy and safety of various active irrigation devices when used with either positive or negative pressure: an in vitro study. *J Endod*. 2012 Dec;38(12):1622-6.

Marinho AC, Martinho FC, Gonçalves LM, Rabang HR, Gomes BP. Does the Reciproc file remove root canal bacteria and endotoxins as effectively as multifile rotary systems? *Int Endod J*. 2014 Jul 29.

Matsushita K, Tajima T, Tomita K, Takada H, Nagaoka S, Torii M. Inflammatory cytokine production and specific antibody responses to lipopolysaccharide from endodontopathic black-pigmented bacteria in patients with multilesional periapical periodontitis. *J Endod*. 1999 Dec;25(12):795-9.

Miller TA, Baumgartner JC. Comparison of the antimicrobial efficacy of irrigation using the EndoVac to endodontic needle delivery. *J Endod*. 2010 Mar;36(3):509-11.

Miranda RG, Santos EB, Souto RM, Gusman H, Colombo AP. Ex vivo antimicrobial efficacy of the EndoVac system plus photodynamic therapy associated with calcium hydroxide against intracanal *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J*. 2013 Jun;46(6):499-505.

Mitchell RP, Yang SE, Baumgartner JC. Comparison of apical extrusion of NaOCl using the EndoVac or needle irrigation of root canals. *J Endod*. 2010 Feb;36(2):338-41.

Naenni N, Thoma K, Zehnder M. Soft tissue dissolution capacity of currently used and potential endodontic irrigants. *J Endod*. 2004;30(II):785-787.

Nair PN. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2004 Nov 1;15(6):348-81.

Nelson-Filho P, Leonardo MR, Silva LAB, Assed S. Radiografic evaluation of the effect of endotoxin (LPS) plus calcium hydroxide on apical and periapical tissues of dogs. *J. Endod*, 28:694-6, 2002.

Nielsen BA, Baumgartner J. Comparison of the EndoVac system to needle irrigation of root canals. *J Endod* 2007;33:611-5.

Parente JM, Loushine RJ, Susin L, Gu L, Looney SW, Weller RN, Pashley DH, Tay FR. Root canal debridement using manual dynamic agitation or the EndoVac for final irrigation in a closed system and an open system. *Int Endod J*. 2010 Nov;43(11):1001-12.

Patel R, Cohenca N. Maturogenesis of a cariously exposed immature permanent tooth using MTA for direct pulp capping: a case report. *Dent Traumatol*. 2006 Dec;22(6):328-33.

Paula-Silva FW, Santamaria M Jr, Leonardo MR, Consolaro A, da Silva LA. Cone-beam computerized tomographic, radiographic, and histologic evaluation of periapical repair in dogs' post-endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009;108:796-805.

Pawar R, Alqaied A, Safavi K, Boyko J, Kaufman B. Influence of an apical negative pressure

irrigation system on bacterial elimination during endodontic therapy: a prospective randomized clinical study. *J Endod*. 2012 Sep;38(9):1177-81.

Peters LB, van Winkelhoff AJ, Buijs JF, Wesselink PR. Effects of instrumentation, irrigation and dressing with calcium hydroxide on infection in pulpless teeth with periapical bone lesions. *Int Endod J* 2002; 35: 13–21.

Ram Z. Effectiveness of root canal irrigation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1977 Aug;44(2):306-12.

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

Rocha CT, Rossi MA, Leonardo MR, Rocha LB, Nelson-Filho P, Silva LA. Biofilm on the apical region of roots in primary teeth with vital and necrotic pulps with or without radiographically evident apical pathosis. *Int Endod J*. 2008 Aug;41(8):664-9.

Rodríguez-Benítez S, Stambolsky Guelfand C, Martín-Jiménez M, Segura-Egea JJ. Root canal disinfection of immature dog teeth with apical periodontitis: Comparison of three different protocols. *J Clin Exp Dent*. 2014 Oct 1;6(4):e357-63. doi: 10.4317/jced.51475. eCollection 2014 Oct.

Saber Sel-D, Hashem AA. Efficacy of different final irrigation activation techniques on smear layer removal. *J Endod*. 2011 Sep;37(9):1272-5.

Salzgeber RM, Brilliant JD. An in vivo evaluation of the penetration of an irrigating solution in root canals. *J Endod*. 1977 Oct;3(10):394-8.

Sathorn C, Parashos P, Messer H. Australian endodontists' perceptions of single and multiple visit root canal treatment. *Int Endod J*. 2009 Sep;42(9):811-8.

Schoeffel GJ. The EndoVac method of endodontic irrigation, part 2--efficacy. *Dent Today*. 2008 Jan;27(1):82, 84, 86-7.

Shin SJ, Kim HK, Jung IY, Lee CY, Lee SJ, Kim E. Comparison of the cleaning efficacy of a new apical negative pressure irrigating system with conventional irrigation needles in the root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010 Mar;109(3):479-84.

Silva LA, Fernandes PM, da Silva RA, Nelson-Filho P, Rocha LB, Rossi MA. SEM Study of apical morphological alterations in primary teeth with vital and necrotic pulps. *Ultrastruct Pathol*. 2009 Oct;33(5):183-8.

Silva LA, Novaes AB Jr, de Oliveira RR, Nelson-Filho P, Santamaria M Jr, Silva RA. Antimicrobial photodynamic therapy for the treatment of teeth with apical periodontitis: a histopathological evaluation. *J Endod*. 2012 Mar;38(3):360-6.

Silva LAB, Nelson-Filho P, Silva RAB, Flores DS, Heilborn C, Johnson JD, Cohenca N. Revascularization and periapical repair after endodontic treatment using apical negative pressure irrigation versus conventional irrigation plus triantibiotic intracanal dressing in dogs' teeth with apical periodontitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010 May;109(5):779-87..

Silva LAB. Pulpotomia em dentes descíduos e permanentes jovens. In: *Odontopediatria: Bases científicas para a prática clínica*. São Paulo: Ed. Artes médicas; 2005. P.571-611.

Silveira AM, Lopes HP, Siqueira JF Jr, Macedo SB, Consolaro A. Periradicular repair after two visit endodontic treatment using two different intracanal medications compared to single-visit endodontic treatment. *Braz Dent J*. 2007;18(4):299-304.

Siqueira JF Jr, Alves FR, Versiani MA, Rôças IN, Almeida BM, Neves MA, Sousa-Neto MD. Correlative bacteriologic and micro-computed tomographic analysis of mandibular molar mesial canals prepared by self-adjusting file, reciproc, and twisted file systems. *J Endod*. 2013 Aug;39(8):1044-50.

Siu C, Baumgartner JC. Comparison of the debridement efficacy of the EndoVac irrigation system and conventional needle root canal irrigation in vivo. *J Endod*. 2010;36:1782-5.

Sjogren U, Figdor D, Persson S, Sundqvist G. Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *Int Endod J*. 1997;30:297-306.

Stashenko P. The role of immature cytokines in the pathogenesis of periapical lesions. *Endod Dent Traumatol*. v.6, p.89-96, 1990.

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

Townsend C, Maki J. An in vitro comparison of new irrigation and agitation techniques to ultrasonic agitation in removing bacteria from a simulated root canal. *J Endod*. 2009 Jul;35(7):1040-3.

Tronstad L, Barnett F, Riso K, Slots J. Extraradicular endodontic infections. *Endod Dent Traumatol*. 1987;3:86-90.

Velickovic M, Pejnovic N, Mitrovic S, Radosavljevic G, Jovanovic I, Kanjevac T, Jovicic N, Lukic A. ST2 deletion increases inflammatory bone destruction in experimentally induced periapical lesions in mice *J Endod*. 2015 Mar;41(3):369-75.

Velmurugan N, Sooriaprakas C, Jain P. Apical Extrusion of Irrigants in Immature Permanent Teeth by Using EndoVac and Needle Irrigation: An In Vitro Study. *J Dent (Tehran)*. 2014 Jul;11(4):433-9. Epub 2014 Jul 31.

Vieira AR, Siqueira JF Jr, Ricucci D, Lopes WS. Dentinal tubule infection as the cause of recurrent disease and late endodontic treatment failure: a case report. *J Endod*. 2012 Feb;38(2):250-4.

Walsh MC, Kim N, Kadono Y, Rho J, Lee SY, Lorenzo J, Choi Y. Osteoimmunology: interplay between the immune system and bone metabolism. *Annu Rev Immunol*. 2006;24:33-63. Review.

Webber RT. Apexogenesis versus apexification. *Dent Clin North Am*. 1984 Oct;28(4):669-97.

Wilson M. Lethal photosensitisation of oral bacteria and its potential application in the photodynamic therapy of oral infections. *Photochem Photobiol Sci*. 2004;3(5):412-8.

Zehnder M. Root canal irrigants. *J Endod*. 2006 May;32(5):389-98. Review.

Anexo

**Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru**

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

CEEPA-Proc. Nº 006/2012

Bauru, 27 de março de 2012.

Senhor Professor,

O projeto de pesquisa encaminhado a esta Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, denominado **Irrigação por pressão negativa (EndoVac) versus irrigação convencional - Estudo histopatológico, imunohistoquímico e histoenzimológico em dentes de cães com lesão periapical**, de autoria de Priscilla Coutinho Romualdo, sob sua orientação foi enviado ao relator para avaliação e considerado **APROVADO** em reunião desta Comissão realizada no dia **26 de março de 2012**.

Solicitamos que ao final da pesquisa seja enviado, para avaliação desta Comissão, um Relatório com os resultados obtidos para análise ética e emissão de parecer final, o qual poderá ser utilizado para fins de publicação científica.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Gustavo Pompermaier Garlet
Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Prof. Dr. Paulo Nelson Filho

Docente do Departamento de Clínica Infantil, Odontologia Preventiva e Social
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - USP

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-101 – C.P. 73

e-mail: mferrari@fob.usp.br – Fone/FAX (0xx14) 3235-8356

<http://www.fob.usp.br>