

LEANDRO MANENTI BITENCOURT

Avaliação *in vivo* da redução microbiana após preparo do canal radicular com auxílio do sistema EndoVac

São Paulo

2012

LEANDRO MANENTI BITENCOURT

Avaliação *in vivo* da redução microbiana após preparo do canal radicular com auxílio do sistema EndoVac

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas.

Área de Concentração: Endodontia

Orientador: Prof. Dr. Celso Luiz Caldeira

São Paulo

2012

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

Catálogo-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Bitencourt, Leandro Manenti.

Avaliação *in vivo* da redução microbiana após preparo do canal radicular com auxílio do sistema EndoVac / Leandro Manenti Bitencourt : orientador Celso Luiz Caldeira. -- São Paulo, 2012.

74 p. : fig., graf., tab. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) -- Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas - Área de concentração - Endodontia. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida

1. Endodontia. 2. Preparo do canal radicular. 3. Microbiota oral. 4. Periodontite periapical I. Caldeira, Celso Luiz. II. Título.

Bitencourt LM. Avaliação *in vivo* da redução microbiana após preparo do canal radicular com auxílio do sistema EndoVac. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas.

Aprovado em: / /2012

Banca Examinadora

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

Julgamento: _____ Assinatura: _____

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

Julgamento: _____ Assinatura: _____

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

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedico esta dissertação ao único e verdadeiro mestre da criação...

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me permitir a realização deste trabalho, pois se não fosse da vontade dele, nada disso seria possível;

À minha fiel e amada companheira, Sabrina, que acreditou e sonhou junto comigo. Esta conquista também é sua. Obrigado por compreender minha ausência e por me fortalecer a cada novo reencontro. Obrigado por me fazer acreditar que como num filme, no final, tudo vai dar certo. Não existem palavras pra te agradecer, simplesmente te amo;

Aos meus familiares, Solete, Leticia e Vanessa, que sempre tiveram uma palavra de apoio e, cheios de amor, souberam me entender mesmo nos momentos mais difíceis. Sem a ajuda e o exemplo de vocês eu jamais seria capaz de finalizar este curso;

Ao meu orientador Prof. Dr. Celso Luiz Caldeira, por me acolher assim que cheguei à FOU SP e por saber conduzir o andamento deste trabalho da melhor forma possível. À você, meu carinho, respeito e amizade;

Ao grande mestre e amigo Prof. Dr. Jacy Simi Jr., por ter me aberto as portas para a docência e por ter sido o grande incentivador para a realização deste mestrado. À você minha eterna gratidão;

Ao coordenador da pós-graduação na área de endodontia da FOU SP, Prof. Dr. Giulio Gavini, por todo amparo durante o curso e pela valiosa ajuda na elaboração e execução deste trabalho. Guardarei para sempre seu exemplo de pessoa e sua sabedoria para lidar com situações de tanta responsabilidade;

Aos professores da disciplina de endodontia da FOU SP, meu muito obrigado por dedicarem suas vidas ao ensino e por tudo o que me passaram ao longo do curso;

Aos professores Wilson Tadeu Felipe e Mara Cristina Santos Felipe, por me ajudarem a dar os primeiros passos e a ser apaixonado pela endodontia;

Ao professor Sylvio Monteiro Junior, o qual, considero um dos maiores mestres que já conheci e que é exemplo de humildade e conhecimento;

Aos funcionários da FOUSP, em especial àqueles que trabalham no departamento de dentística, nas pessoas de Ana Maria, Leandro, Selma, Aldo e Sônia. Muito obrigado por toda a simpatia e prestatividade ao longo desses anos;

Aos colegas de mestrado e doutorado, principalmente aqueles que estiveram comigo do início ao fim (George Candeiro, Rodrigo França, Mário Leonardo, Regina Shin, Felipe Ferreira e Gustavo Rubino). O que vivemos juntos ficará guardado para sempre em minha memória. Desejo sucesso a todos vocês e que possamos nos encontrar muitas outras vezes para relembrar os momentos aqui vividos;

Aos meus queridos amigos, que estando longe ou perto, sempre tiveram papel fundamental para compartilhar alegrias e tristezas;

À Prof. Dra. Ericka Tavares Pinheiro, pela gentileza e disposição em ajudar e ensinar. Sua participação foi fundamental na realização deste projeto;

À Prof. Dra. Marcia Mayer e todos os colegas e técnicos do laboratório de microbiologia oral do ICB, por me abrirem as portas e acolherem da melhor forma possível;

Aos Professores do curso de especialização em endodontia da FUNORTE – núcleo Florianópolis (Marcos Rogério Rabello e Cristiani Maria Chaves de Figueiredo) pelo exemplo, amizade e companheirismo;

À minha secretária Elisângela Colombo, por todo auxílio na execução desta pesquisa e por tomar conta do consultório, administrando bem as situações sempre que estive fora;

A todos os alunos de especialização e graduação que tive a honra de trabalhar, obrigado por diariamente me ensinarem o que é endodontia de verdade;

Aos colegas de profissão em Criciúma-SC, por confiarem no meu trabalho mesmo quando por muitas vezes não pude atendê-los prontamente;

A todos os pacientes que confiaram até hoje sua saúde às minhas mãos;

À CAPES pela bolsa concedida durante o curso;

À todos que de uma forma ou de outra colaboraram ou torceram pela realização deste sonho...

"O conhecimento científico é cumulativo, dependente do desenvolvimento de novas tecnologias e idéias. Nossas verdades permanecem verdadeiras até que alguém demonstre que elas são incompletas. No mínimo, esta perspectiva deveria nos ensinar a defender nossas verdades temporárias com a humildade de quem aprende com o passado."

Marcelo Gleiser

RESUMO

Bitencourt LM. Avaliação *in vivo* da redução microbiana após preparo do canal radicular com auxílio do sistema EndoVac [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2012. Versão corrigida.

O presente estudo teve por objetivo avaliar *in vivo* a eficácia do preparo de canais radiculares na redução bacteriana em dentes portadores de periodontite apical primária, com auxílio do sistema EndoVac de irrigação e aspiração. Foram coletadas amostras dos canais radiculares de 20 pacientes, antes (S1) e após (S2) o preparo com instrumentos rotatórios Protaper, variando somente a técnica utilizada para irrigação e aspiração: Grupo A (irrigação convencional – n=10) e Grupo B (irrigação com auxílio do sistema EndoVac – n=10). Após a extração do DNA presente nas amostras, este foi quantificado através da reação de PCR em tempo real, pelo método SYBR Green, identificando o número de cópias do gene 16SrRNA. Em todas as amostras, com exceção de uma pós-preparo com EndoVac, foram identificadas cópias do gene alvo. A média para todos os casos foi de $1,6 \times 10^8$ e $8,8 \times 10^5$ cópias do 16SrRNA, antes e após o preparo, respectivamente. Para os grupos isoladamente, os mesmos valores foram: $2,0 \times 10^8$ e $5,5 \times 10^5$ (convencional), e $1,1 \times 10^8$ e $1,2 \times 10^6$ (EndoVac). O percentual médio de redução foi de 97,52% (97,02% para convencional e 98,04% para o EndoVac). O teste de Mann-Whitney permitiu concluir que ambas as técnicas reduziram significativamente os microrganismos presentes antes do preparo ($p < 0,0001$), sem haver diferença entre as mesmas ($p = 0,9705$). Nenhuma das técnicas foi efetiva na eliminação completa de bactérias sob a metodologia utilizada. A eficácia antibacteriana do sistema EndoVac, sob esta metodologia, foi semelhante a obtida com a irrigação e aspiração convencional.

Palavras-chave: Sistema EndoVac. Pressão apical negativa. Reação em cadeia da polimerase em tempo real. Infecção endodôntica. Redução bacteriana.

ABSTRACT

Bitencourt LM. *In vivo* evaluation of microbial reduction after root canal preparation with the aid of the EndoVac system [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2012. Versão corrigida.

The present study aimed to analyze *in vivo* the effectiveness of root canal preparation on bacterial reduction in patients's teeth with primary apical periodontitis. Samples were collected from 20 patients before (S1) and after (S2) preparation with ProTaper rotary files, varying only the technique used for irrigation and aspiration: Group A (conventional irrigation - n = 10) and Group B (with the aid of EndoVac system - n = 10). After extraction, the DNA present in the samples was quantified by real-time PCR with the SYBR Green method, identifying the number of 16SrRNA gene copies. In all samples, except for a post-preparation case with EndoVac, copies of the target gene were identified. Average for all cases was $1,6 \times 10^8$ and $8,8 \times 10^5$ copies of the 16SrRNA, before and after preparation, respectively. For the groups separately, the same values were $2,0 \times 10^8$ and $5,5 \times 10^5$ (conventional) and $1,1 \times 10^8$ and $1,2 \times 10^6$ (EndoVac). The mean percentage of reduction was 97.52% (97.02% for the conventional and 98.04% for the EndoVac). The Mann-Whitney test concluded that both techniques significantly reduced the microorganisms after preparation ($p < 0,0001$), with no differences between them ($p = 0,9705$). None of the techniques were effective in the complete elimination of bacteria under this methodology. The antibacterial efficacy of the EndoVac system under this methodology was similar to that obtained with conventional irrigation and aspiration.

Keywords: EndoVac System. Apical negative pressure. Real-time polymerase chain reaction. Endodontic infection. Bacterial reduction.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1 PREPARO QUÍMICO MECÂNICO DO SISTEMA DE CANAIS RADICULARES.....	14
2.2 FATORES A CONSIDERAR DURANTE A IRRIGAÇÃO E ASPIRAÇÃO EM ENDODONTIA	16
2.2.1EXTRAVASAMENTO APICAL	18
2.3 SISTEMA ENDOVAC	20
2.4 MICROBIOLOGIA ENDODÔNTICA.....	31
3 PROPOSIÇÃO	40
4 MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1 SELEÇÃO DOS PACIENTES	41
4.2 ESTERILIZAÇÃO E CUIDADOS COM ASSEPSIA.....	42
4.3 PROCEDIMENTOS CLÍNICOS INICIAIS E PRIMEIRA COLETA	42
4.4 PREPARO DO CANAL E SEGUNDA COLETA	43
4.5 PCR EM TEMPO REAL	47
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	49
5 RESULTADOS	50
6 DISCUSSÃO	52
7 CONCLUSÕES	62
REFERÊNCIAS	63
ANEXO	74

1 INTRODUÇÃO

A contaminação da polpa por microrganismos é a causa mais freqüente dos problemas endodônticos, a presença de bactérias no conteúdo necrótico coletado de canais radiculares comprometidos foi observada por diversos autores, antes mesmo dos anos 60 (Brown; Rudolph, 1957; Winkler; van Amerongen, 1959), mas, naquele momento, não se sabia ao certo quais os mecanismos de patogenicidade destes microrganismos e quais repercussões eles causavam nos tecidos afetados.

Atenção maior vem sendo dada ao papel dos microrganismos como principais causadores das doenças da polpa e do periápice desde os anos 60, com o estudo clássico de Kakehashi et al. (1965), que demonstrou, através do trabalho com animais comuns e *germ-free*, a necessidade da presença de contaminação por microrganismos para o desenvolvimento de periapicopatias, o que foi ratificado por Sundqvist (1976) e por Fabricius et al. (1982).

O processo pelo qual a infecção dos canais radiculares leva a reabsorção óssea periapical foi estudado e descrito na literatura ao longo dos anos, principalmente através de estudos *in vivo* utilizando-se animais (Wang; Stashenko, 1991; Stashenko et al., 1992). O desenvolvimento da lesão periapical envolve uma série de respostas do organismo hospedeiro, em decorrência de agentes agressores diretos e indiretos dos patógenos, como, por exemplo, as endotoxinas, ou lipopolissacarídeos (LPS), presentes nas bactérias Gram-negativas.

Os estudos de microbiologia em endodontia, que utilizaram técnicas de cultura como metodologia, apontam que, dentre os principais microrganismos encontrados nas infecções dos canais radiculares, espécies bacterianas anaeróbias Gram-negativas são as mais comumente identificadas (Sundqvist, 1976; Assed et al., 1996; Abou-Rass; Bogen, 1998).

O emprego dos métodos moleculares possibilitou o surgimento de uma nova era para o diagnóstico em microbiologia. Os estudos permitem afirmar que as infecções endodônticas primárias são do tipo mista, polimicrobianas e dinâmicas, com complexa interação microbiana entre as espécies. Os métodos de cultura, por suas limitações, apresentavam dificuldades para o crescimento e identificação de espécies, pois boa parte da microbiota endodôntica ainda não é cultivável. O

advento das técnicas moleculares permitiu o conhecimento de um número extremamente maior de espécies, abrindo um leque imenso de possibilidades para entendimento da interrelação entre as espécies e de que forma esta infecção evolui (Martinho, 2007).

Uma das técnicas moleculares mais empregadas atualmente no estudo da microbiologia endodôntica é a reação em cadeia pela enzima polimerase ou *polymerase chain reaction* (PCR), com suas diversas variações. Uma delas, o PCR em tempo real, diferente das demais, permite uma análise quantitativa do ácido desoxirribonucleico (DNA) bacteriano presente nas amostras avaliadas (Siqueira; Rôças, 2005).

Mesmo com a evolução das técnicas de cultura, e com o desenvolvimento da biologia molecular, as bactérias anaeróbias Gram-negativas continuam exercendo posição de destaque na infecção endodôntica (Gomes et al., 2004; Sassone et al., 2007; Vianna et al., 2008). A eliminação destes microrganismos, com seus fatores de virulência diretos e indiretos, ou sua redução a níveis toleráveis para o hospedeiro, está intimamente ligada ao sucesso da terapia endodôntica.

O preparo mecânico por si só não é capaz de atingir todas as regiões do canal, deixando áreas não trabalhadas onde a ação de substâncias químicas é fundamental (Spångberg, 1982; Byström; Sundqvist, 1983; Wu; Wesselink, 2001). Além disso, as bactérias e o LPS se alojam também no interior dos túbulos dentinários e nas reentrâncias do complexo sistema de canais radiculares, exigindo que as substâncias químicas penetrem o mais profundo possível para atingi-los. A utilização de medicações intra-canal também pode colaborar na erradicação da infecção, mas apresenta a mesma dificuldade em atingir toda a microanatomia radicular.

Entendendo-se as limitações da instrumentação mecânica e das substâncias químicas utilizadas usualmente, parece ser válido associar à ação mecânica dos instrumentos, algum dispositivo que auxilie o fluxo hidrodinâmico que “lava” o canal radicular, removendo debris, bactérias e seus bioprodutos, e que facilite a chegada de substância química em toda extensão dos canais. Desta forma, uma atenção especial deve ser dada a técnica utilizada para irrigação e aspiração. O uso de aparelhos de ultra-som ou de sistemas que utilizam pressão apical negativa, como o EndoVac (Discus Dental, Culver City, CA, USA) (Nielsen; Baumgartner,

2007), podem ser a chave para melhorar a desinfecção durante o preparo químico mecânico, favorecendo as condições para a ocorrência da reparação tecidual.

O sistema EndoVac, permite que a solução irrigadora alcance a região apical dos condutos, com baixo risco de extravasamento (Desai; Himel, 2009). Além disso, em razão do fluxo invertido, eliminam-se bolhas de ar, formadas normalmente em sistemas fechados, o que evita a ocorrência do efeito *vapor lock*, que impede a substância química de alcançar toda a extensão dos canais radiculares (Schoeffel, 2008a).

Com relação à redução antimicrobiana após o preparo com auxílio do sistema EndoVac, diversos autores observaram redução significativa dos microrganismos, com percentuais acima daqueles encontrados com irrigação e aspiração convencional (Hockett et al., 2008; Townsend; Maki, 2009; Brito et al., 2009; Miller; Baumgartner, 2010). Todos estes trabalhos foram realizados *in vitro* com técnicas tradicionais de cultura, avaliando principalmente a presença de *E. faecalis*. Os trabalhos *in vivo* são ainda escassos. Em um deles Cohenca et al. (2010), mostrou que o preparo com uso do sistema EndoVac reduziu *E. faecalis* em dentes imaturos de cães a níveis estatisticamente iguais aos encontrados em amostras coletadas após o uso de medicação intracanal com pasta triantibiótica.

O estudo da redução de bactérias em canais radiculares após o preparo químico mecânico e irrigados com o sistema EndoVac foi observado somente através das técnicas de cultura bacteriana. O objetivo deste trabalho é avaliar *in vivo* esta redução, em pacientes portadores de dentes com periodontite apical, através de uma metodologia de biologia molecular, o PCR em tempo real.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 PREPARO QUÍMICO MECÂNICO DO SISTEMA DE CANAIS RADICULARES

Durante a terapia endodôntica, associado ao preparo realizado com instrumentos que possuem capacidade de corte, deve-se utilizar uma substância química auxiliar, irrigando e aspirando o conteúdo dos canais com alguns objetivos principais: favorecer o corte, evitar o acúmulo de debris, remover ou dissolver material orgânico, eliminar bactérias e seus bioprodutos, encontrados no interior dos canais e dos túbulos dentinários (Luebke, 1967).

Foi Schilder (1974) quem instituiu muitos dos conceitos de limpeza e modelagem aceitos até hoje na endodontia, que postulam a ação conjunta de instrumentos de corte e substâncias químicas auxiliares.

Para Goldman et al. (1976) as soluções irrigadoras usadas em endodontia devem ter a capacidade de remover tecido necrótico ou inflamado sem causar irritação aos tecidos perirradiculares, além de serem bactericidas.

O preparo mecânico não tem a capacidade de atingir todas as regiões do canal, sendo que em algumas reentrâncias permanecem sujidades, restos teciduais e microrganismos. Com o intuito de dissolvê-los e removê-los do conduto é preciso lançar mão das substâncias químicas auxiliares (Goldman et al., 1981).

O objetivo do preparo químico mecânico é eliminar microrganismos e os detritos favoráveis à sua proliferação, desinfetar e limpar o sistema endodôntico e propiciar um formato adequado ao canal, favorecendo a sua obturação (Moura, 1985; Prokopowitsch, 1988; Aun, 1990; Paiva; Antoniazzi, 1991).

Como resultado da ação dos instrumentos e da substância química auxiliar no canal radicular, temos a formação do *smear layer*, que Ciucchi et al. (1989) definem como restos umedecidos de matéria calcificada, que é compactada contra as paredes dentinárias e para o interior dos túbulos dentinários. Os mesmos autores ainda listam três razões para diminuir a formação ou remover essa camada. Segundo eles, ela pode conter ou selar microrganismos nos túbulos dentinários, evitar a penetração e ação das soluções antibacterianas, e prejudicar o selamento tridimensional dos canais com a massa obturadora. Os autores observaram neste

estudo uma diferença de até 30% na limpeza entre o terço apical e coronal, atribuindo esta diferença principalmente à distribuição limitada do irrigante nesta região, em função da presença de curvaturas e do pequeno diâmetro que se encontra apicalmente nos condutos.

Holland et al. (1990) mostraram que os detritos podem ser encontrados condensados na porção mais apical, ou muitas vezes tendo o canal principal livre, mas com os canalículos que formam o delta apical obliterados pela ação de êmbolo dos instrumentos. Os mesmos autores afirmam que a qualidade do selamento final em uma obturação é dependente de todos os outros passos anteriores. O objetivo é buscar uma ótima adaptação tridimensional às paredes dos canais, inclusive e principalmente em sua porção mais apical. Fatores como a falta de cimento obturador, presença de umidade e principalmente detritos ali condensados, podem comprometer o tratamento. Além disso, nesses espaços vazios, ou acumulado junto aos detritos, podemos encontrar colônias bacterianas associadas a matéria orgânica em decomposição e, neste caso, o tratamento poderá não obter êxito.

Para Gavini et al. (1994) a presença da lama dentinária gera grande inquietação, pois dificulta o contato direto dos fármacos de uso endodôntico com a contaminação lipoprotéica e com as possíveis bactérias presentes no interior do canal e dos túbulos dentinários. No mesmo trabalho, classificam a lama dentinária em duas camadas com espessuras diferentes, sendo a mais superficial menos aderida, e a mais profunda aderida firmemente a parede dos canais, em função da penetração no interior dos túbulos dentinários, tamponando-os.

A penetração da *smear layer* nos túbulos dentinários, pode ser chamada de *smear plug* e, segundo Lopes et al. (1996), a extensão da penetração pode chegar a 40 micrometros de profundidade para o interior dos túbulos dentinários.

Simi Junior et al. (1999) nos dão uma definição bem organizada pelas palavras para endodontia quando a define sendo “uma especialidade envolta de minúcias técnicas, de cujo acerto depende a intervenção bem realizada”. Qualquer descuido, em algum dos passos, pode resultar em falha ao final da terapia. Os autores ressaltam ainda a importância conjunta dos cuidados químicos e mecânicos. Ambos não podem ser dissociados, e através deste sinergismo é que proporcionam a sanificação e modelagem do canal radicular. A ação mecânica do instrumento promove o corte da dentina, mas é essencial que haja um fluxo hidrodinâmico para que os detritos gerados sejam removidos do canal. Além disso, a solução irrigadora

auxilia o corte através da lubrificação e, principalmente, tem ação antibacteriana, procedendo a desinfecção dos canais.

Neste mesmo sentido, para Soares e Goldberg (2001), todas as etapas têm sua importância no tratamento e se completam. É preciso um bom acesso para conseguir limpar, esvaziar, modelar e desinfetar o canal, e somente desta forma obter uma obturação dentro dos padrões desejados.

Deve-se atentar ainda que a anatomia interna dos dentes humanos é complexa, variável e representa um fator de dificuldade no momento do tratamento. O dente dificilmente apresenta um único canal, mas sim um sistema complexo de canais, composto por canais laterais, colaterais, recorrentes, secundários, acessórios, reticulares, apresentando algumas vezes múltiplas aberturas foraminais (Baratto-Filho et al., 2004).

A sanificação deve atingir todas essas áreas de difícil acesso, seja com a instrumentação ou através da irrigação, lembrando que, conforme Khademi e Feizianfard (2004) a maior quantidade de resíduos tende a se acumular no terço apical dos canais, onde a complexidade anatômica é ainda maior.

O padrão ideal de um preparo químico mecânico para Hockett et al. (2008), seria aquele que proporcionasse a obtenção de culturas negativas do interior do canal e região periapical em todas as situações, objetivo ainda não atingido por qualquer protocolo.

Os trabalhos mais recentes, que avaliaram a capacidade do preparo químico mecânico na redução da microbiota endodôntica, apontam que a redução gira em torno de 95 a 99% em média (Tang et al., 2004; Vianna et al., 2006; Sakamoto et al., 2007; Blome et al., 2008; Vianna et al., 2008; Jiang et al., 2009; Roças; Siqueira 2010; Alves et al., 2012).

2.2 FATORES A CONSIDERAR DURANTE A IRRIGAÇÃO E ASPIRAÇÃO EM ENDODONTIA

Para que a substância química cumpra seus objetivos, é importante não somente que o agente irrigante tenha ação, mas sim que ele possa ter contato com as regiões onde deve atuar. Esse contato com todas as paredes do canal e debris

nele encontrados, depende da capacidade de umectação da solução, e para líquidos, esta propriedade está diretamente relacionada com a sua tensão superficial, definida como sendo a força entre as moléculas que produz a tendência para que a área de superfície de um líquido diminua. Neste quesito, tanto o hipoclorito de sódio como o EDTA, apresentam, dentre as soluções mais comumente utilizadas em endodontia, os melhores valores, sustentando o uso de ambos para que haja uma penetração e contato com o maior número possível de paredes (Pecora et al., 1991; Tasman et al., 2000; Giardino et al., 2006).

Quanto ao tempo de aplicação da solução irrigadora, Teixeira et al. (2005) consideram como fator importante a ser observado. Em um estudo no qual aplicaram NaOCl e EDTA por 1 minuto, 3 minutos e 5 minutos, em diferentes grupos, observaram que na região apical, os dentes nos quais as soluções permaneceram por apenas 1 minuto no interior do canal, apresentaram maior quantidade de lama dentinária do que nos grupos onde elas permaneceram por 3 e 5 minutos.

Outros fatores a serem considerados, são o diâmetro e a conicidade do preparo, o tipo de agulha que se utiliza, e a distância que esta é posicionada em relação ao comprimento de trabalho. Hsieh et al. (2007) concluíram que um bom alargamento desde a cervical, removendo obstáculos, e um preparo apical mínimo, permitem que a solução flua mais facilmente para todas as regiões, principalmente a apical, onde as condições de limpeza são mais críticas. Em uma análise térmica de imagens da penetração do irrigante, concluíram que a distribuição da solução pode ser afetada pelo uso de agulhas com grande calibre, por grandes distâncias desde a ponta da agulha até o término da raiz e pelo pouco alargamento do conduto. No mesmo estudo, mostram que uma agulha de 27 gauge, posicionada a 3 mm do comprimento de trabalho em um conduto alargado apicalmente até uma lima #30, permite a penetração de irrigante em toda extensão do canal radicular. Segundo o estudo, a uma distância de 9 mm do comprimento de trabalho, nenhuma agulha, independente do diâmetro final do preparo, foi capaz de fazer a solução alcançar a região apical.

Boutsioukis et al. (2007) afirmam que o uso de agulhas de baixo calibre parece obvio para alcançar uma maior penetração nos canais. No entanto, demonstraram que agulhas mais finas causam uma pressão maior do êmbolo, podendo resultar em um extravasamento com maior potência da solução na ponta da agulha.

O volume de solução que é levada para o interior dos canais radiculares também pode influenciar na capacidade de limpeza e desinfecção do preparo. Huang et al. (2008), encontrou uma relação diretamente proporcional entre o volume de solução utilizado e a qualidade da limpeza dos sistemas de canais radiculares, sendo que, desta forma, quanto mais solução é levada aos condutos, melhor será a remoção de detritos e microrganismos de seu interior. Quanto maior o volume de solução levada aos canais, maior também é o fluxo produzido, o que certamente favorece a limpeza. Além disso, um grande volume de solução também permite que sempre haja renovação do conteúdo que está nos canais, com maior potencial para a ocorrência das reações químicas que levam a eliminação de resíduos e microrganismos.

Vera et al. (2012) levantam outra questão referente a irrigação, no que diz respeito a formação de bolhas no interior dos canais. Segundo os autores, o diâmetro reduzido dos canais faz com que haja a formação de bolhas em seu interior, principalmente nos terços médio e apical. Estas bolhas, por sua vez, impedem o contato direto das soluções irrigadoras com as paredes dentinárias, prejudicando a limpeza. Para minimizar este inconveniente, sugerem a agitação através de limas, espiral lentulo ou qualquer outro dispositivo de agitação, com intuito de eliminar as bolhas formadas. A realização da manobra de patência contribui de forma positiva para a diminuição deste fenômeno nos terços médio e cervical, mas não o elimina por completo.

2.2.1 EXTRAVASAMENTO APICAL

Quando utilizam-se substâncias químicas auxiliares, não pode-se deixar de considerar o potencial agressor das soluções. Masillamoni et al. (1981) afirmam que a maior parte das soluções irrigadoras utilizadas comumente em endodontia, principalmente o hipoclorito de sódio e o ácido diamino tetracético (EDTA), cumprem bem seus papéis como antimicrobianos ou quelantes. Por outro lado, causam não só dano bacteriano, mas também lesão às células e tecidos vizinhos sadios, que poderiam auxiliar em um reparo mais rápido. Nas concentrações atuais, principalmente o hipoclorito de sódio, mas também o EDTA, são danosos aos

tecidos saudáveis, e diluindo-os a uma concentração biocompatível, sua ação antibacteriana ou quelante é comprometida. Portanto, muito cuidado deve ser observado durante seu uso, para que a solução se limite ao interior do sistema de canais radiculares. Os mesmos autores ainda sugerem, como medidas preventivas para não extravasar substância química auxiliar além do forame, o uso de pouca pressão na irrigação e o respeito a uma distância de segurança aquém da abertura foraminal. A abertura lateral das agulhas de irrigação também minimiza os riscos, porém, não os esgota.

Çaliskan et al. (1994), apresentam um relato de caso, mostrando que alergia ao NaOCl pode ser encontrada em algumas pessoas. No caso apresentado, a paciente apresentou dificuldade para respirar e parestesia labial superior após irrigação com hipoclorito e precisou ser encaminhada às pressas para um hospital. Os sinais e sintomas desapareceram completamente em 10 dias.

Hülsmann e Hahn (2000) fazem mais um relato de caso onde houve extravasamento de hipoclorito de sódio com sintomas parecidos. O pH das soluções contendo esta substância gira em torno de 11 ou 12, e causa injúria primariamente pela oxidação de proteínas nos tecidos vivos. Os autores também citam como medida de prevenção o uso das agulhas aquém do limite apical e com pouca pressão.

Gernhardt et al. (2004) relatam um caso de extravasamento de NaOCl a 5,25% em um pré-molar inferior em razão de uma perfuração não diagnosticada. A paciente apresentou dor dois minutos após a irrigação, uma sensação de queimor e imediato edema labial. Algum tempo depois, o rosto apresentou vermelhidão, e a mucosa oral, sinais de necrose.

Spencer et al. (2007), em um artigo de revisão sobre o hipoclorito de sódio, citam diversos riscos e complicações inerentes a sua utilização, como: dano às roupas, aos olhos, à pele e à mucosa oral. Além disso, segundo os autores, ao extravasar solução contendo NaOCl além do forame radicular, existe uma queimadura química aos tecidos atingidos, seguida por necrose. Uma reação inflamatória severa é esperada, causando exsudação e sinais intra e extra orais. Em casos mais graves, o NaOCl pode causar complicações neurológicas ou obstrução das vias aéreas superiores. O paciente deve receber medicação anti-inflamatória imediata, e em algumas situações, anti-histamínicos e antibióticos também estão

indicados. Além disso, cabe ao profissional responsável o acompanhamento direto da situação até a regressão total dos sinais e sintomas.

2.3 SISTEMA ENDOVAC

O sistema EndoVac surgiu a partir da necessidade de obter-se uma irrigação adequada da porção apical de canais radiculares, com baixo risco de extravasamento para os tecidos adjacentes, que pode facilmente ocorrer quando se trabalha com pressão positiva muito próximo ao limite apical do preparo.

Fukumoto et al. (2006), foram os primeiros autores a sugerirem uma técnica segura e eficaz, na qual há inversão do fluxo normalmente utilizado durante a irrigação em endodontia. Esta nova proposta de abordagem, utilizando uma cânula de aspiração nas proximidades (2 a 3 mm) do comprimento de trabalho e tendo a agulha de irrigação liberando solução na câmara pulpar, foi comparada com o método convencional de pressão positiva. As análises das fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) demonstraram haver diferença estatisticamente significativa no grau de limpeza da porção apical, com resultados favoráveis à pressão negativa. Além de uma remoção maior da lama dentinária, a aspiração intracanal com pressão negativa produziu níveis menores de extravasamento apical.

Trope (2006) cita pela primeira vez na literatura o uso do EndoVac. Em um estudo a respeito do tratamento de dentes com formação radicular incompleta, sugere o uso do dispositivo como uma alternativa viável para um tratamento de sucesso nestes tipos de casos, onde a amplitude foraminal da raiz, ainda em formação, aumenta o risco de extravasamento.

Nielsen e Baumgartner (2007) descreveram pela primeira vez na literatura o uso do EndoVac. Uma ponta de liberação/evacuação é ligada a uma seringa de irrigação e à pressão da bomba de sucção da cadeira dentária. Um tubo pequeno liga ou a macro ou a micro cânula para realizar a sucção. A ponta de liberação/evacuação libera a solução irrigadora e ao mesmo tempo o excesso é sugado pela macro ou microcânula. A macrocânula é feita de plástico e com diâmetro #55 *International Standards Association* (ISO), possuindo *taper* .02. A

microcânula é feita em metal e tem 12 pequenos orifícios laterais, sendo fechada na ponta e com diâmetro final #32 (ISO). À medida que essas cânulas entram no canal, uma pressão negativa joga a solução até a ponta e a remove por sucção. A microcânula pode ser usada até o comprimento de trabalho em um canal preparado até #35 ou mais. No mesmo estudo, os autores demonstraram por análise de cortes seriados em microscopia óptica, que o EndoVac proporcionou uma remoção de detritos significativamente maior a 1 mm do comprimento de trabalho, quando comparado à irrigação com seringa comum. A 3 mm da mesma medida, não houve diferença significativa entre os métodos. Outra variável analisada na pesquisa, também apontou que o EndoVac é capaz de levar um volume maior de solução aos condutos, num mesmo período de tempo.

O inventor do sistema é o norte-americano Jonh Schoeffel. Schoeffel (2007) dá início a uma série de 4 artigos nos quais ele aborda a questão da segurança durante a irrigação, da eficácia do dispositivo e ainda descreve os componentes e o uso clínico. No primeiro artigo da série, o autor discorre sobre os problemas enfrentados quando se trabalha com pressão apical positiva em um sistema fechado como é o sistema de canais radiculares. As principais dificuldades são conseguir um bom grau de limpeza da região apical e o risco de ocorrerem acidentes, a maioria deles relacionados ao hipoclorito de sódio em suas diferentes concentrações.

Schoeffel (2008a), no segundo artigo da série de 4, fala sobre a eficácia do sistema EndoVac em alcançar níveis maiores de limpeza na região apical. Ele explica sobre a formação de bolhas de ar no interior dos canais quando se realizam os procedimentos endodônticos. Estas bolhas podem se unir na região apical, formando uma grande bolha e originando um efeito também conhecido como *vapor lock*, que impede que a solução tenha condições de fluir e ter contato com todas as áreas desejadas. Para o autor, com o posicionamento das pontas de aspiração próximas ou mesmo no limite do comprimento de trabalho, estas bolhas podem ser facilmente eliminadas, e a solução ter sua ação facilitada.

O terceiro dos 4 artigos publicados por Schoeffel (2008b) apresenta uma descrição detalhada de cada componente do EndoVac e suas funções, mostrando como se dá a interação entre eles em cada etapa do tratamento.

Com a disponibilização do sistema no mercado, o interesse por parte de profissionais e pesquisadores motivou estudos avaliando o uso do EndoVac sob

diferentes variáveis relacionadas ao tratamento endodôntico. Hockett et al. (2008), pesquisaram a eficácia antimicrobiana do protocolo de irrigação com o sistema EndoVac sobre o *Enterococcus faecalis*. Os autores também compararam a influência do alargamento apical e da conicidade do preparo na eliminação destes microrganismos. Em todos os espécimes do trabalho irrigados com o sistema de pressão apical negativa foram obtidas culturas negativas após 48 horas, o que não foi observado quando a pressão positiva tradicional foi utilizada. Com relação à conicidade e ao diâmetro apical do preparo, não foi observado qualquer tipo de correlação com a eliminação destes microrganismos.

Kurtzman (2009) escreveu um artigo comentando os benefícios em realizar a irrigação e aspiração com o sistema EndoVac. De acordo com o autor, a principal vantagem é a capacidade de limpeza apical com riscos controlados, e a possibilidade de se trabalhar com volumes maiores de solução irrigadora. Ele enfatiza que, ao favorecer a limpeza do sistema de canais radiculares, o uso da pressão apical negativa pode permitir um selamento mais hermético dos espaços livres pela massa obturadora.

Desai e Himel (2009) avaliaram a segurança de alguns sistemas de irrigação através da mensuração do percentual de solução extravasada pelo forame. Os sistemas avaliados foram: EndoVac (macro e micro cânulas), EndoActivator (Advanced Endodontics, Santa Barbara – CA, USA), irrigação manual com agulha Max-IProbe (Max-I-Probe; Dentsply International, York - PA, USA), irrigação ultrasônica com seringa (Becton Dickinson & Co, Franklin Lakes – NJ, USA) e RinsEndo (Co. Duerr-Dental, Bittigheim-Bissingen, Germany). Os únicos dois grupos que não apresentaram extravasamento foram a macro e micro cânulas do sistema EndoVac. O grupo no qual foi utilizado o EndoActivator, apresentou pequena quantidade de solução extravasada (em torno de 5%), não sendo estatisticamente diferente dos grupos do EndoVac. Todos os outros grupos (manual, ultrasônica ou RinsEndo) mostraram volumes maiores de extravasamento apical (entre 60 e 80%), com diferença estatística para o EndoVac e o EndoActivator, mas estatisticamente iguais entre si.

Gu et al. (2009) realizaram uma revisão de literatura acerca dos métodos disponíveis até a data de encerramento da revisão para realizar a agitação das soluções no interior dos canais radiculares. Classificaram os mecanismos, colocando o EndoVac como um dispositivo de pressão alterada. Concluíram que, pelas

limitações dos estudos e pela quantidade de variáveis envolvidas, é muito difícil ainda afirmar que há evidências científicas de que a melhora na limpeza dos canais proporcionada por qualquer sistema possa resultar em um aumento no índice de sucesso nos tratamentos.

Schoeffel (2009) termina sua série de artigos com uma publicação onde mostra o protocolo clínico de preparação e uso do EndoVac. Ele enfatiza algumas dicas clínicas com relação à sequência do protocolo para evitar entupimento das cânulas e aos cuidados com os procedimentos de esterilização e manutenção da cadeia asséptica. Além disso, discute os resultados favoráveis apresentados na literatura com relação à segurança, limpeza e desinfecção.

Townsend e Maki (2009) compararam a capacidade de remoção de bactérias com o uso de: vibração ultrassônica, irrigação com agulha, EndoVac, EndoActivator, vibração sônica e F-File (Plastic Endo, Lincolnshire – IL, USA). Blocos plásticos padronizados com curvaturas de 30° foram utilizados para o estudo. O preparo também foi padrão em todos os grupos, sendo realizado de forma mecanizada e finalizado com um diâmetro 35.06. Após o preparo dos canais, os espécimes foram esterilizados e receberam inoculação com *Enterococcus faecalis*. A solução de escolha foi o soro fisiológico, de forma que se avaliasse apenas o efeito do sistema de irrigação, e não a ação química das soluções. Finalizada a irrigação/agitação com cada sistema, os blocos preparados foram irrigados com 0,1% cristal de violeta para corar as bactérias remanescentes, e analisados por espectrofotometria. A análise dos resultados demonstrou não haver diferença significativa entre a agitação ultrassônica e o grupo controle positivo. Também não houve diferença estatística entre a agitação ultrassônica e EndoActivator, F-File ou agitação sônica. A agitação ultrassônica foi mais eficiente em remover bactérias sob a metodologia empregada quando comparada a irrigação com agulha ou ao EndoVac.

Mesmo em anatomias mais complexas, o uso do sistema EndoVac pode auxiliar a chegada de substância química em toda extensão apical com segurança. Gondim et al. (2009) publicaram um relato de caso de um incisivo central superior com periodontite apical primária e presença de fístula, apresentando duas raízes e três canais. Para irrigação, descrevem o uso do EndoVac durante o preparo químico mecânico com posterior colocação de curativo de hidróxido de cálcio e obturação. A preservação do paciente mostrou sucesso clínico e radiográfico após 12 meses,

com ausência de sinais e sintomas e presença de neoformação óssea detectável com radiografia periapical.

Brito et al. (2009) pesquisaram a redução bacteriana em dentes *ex vivo* com três diferentes técnicas de irrigação: EndoVac, agulhas NaviTip (Ultradent, South Jordan – UT, USA) e EndoActivator. Setenta caninos foram preparados e inoculados com *Enterococcus faecalis* por 7 dias. Quatro espécimes foram levados à análise por microscopia de varredura, comprovando a formação e presença de biofilme. Os demais dentes foram divididos aleatoriamente em 3 grupos experimentais, contendo 20 dentes cada um, mais um grupo controle com 6 espécimes. Amostras foram coletadas do interior dos canais radiculares com auxílio de pontas de papel absorvente antes e após o preparo, feito com instrumentação rotatória e soluções de NaOCl 2,5% e EDTA 17%. As mesmas foram processadas e levadas para análise por cultura através da contagem de unidades formadoras de colônia (CFU). Os resultados demonstraram que todas as técnicas testadas foram eficazes em reduzir os microrganismos viáveis (acima de 99 % de redução entre a primeira e segunda coleta), apresentando diferença estatística quando comparadas ao grupo controle. Entre as técnicas avaliadas, não houve diferença estatisticamente significativa no que diz respeito à redução de *Enterococcus faecalis in vitro*.

O primeiro estudo *in vivo* com o uso do EndoVac foi realizado por Cohenca et al. (2010). Os autores trabalharam em cães que possuíam dentes imaturos com presença de periodontite apical (n=72). Foram comparados dois protocolos de desinfecção no preparo: EndoVac ou irrigação convencional seguida de medicação intra canal por 14 dias com pasta triantibiótica (metronidazol, ciprofloxacina e minoxiclina). As coletas foram realizadas logo após a cirurgia de acesso (S1) e após a irrigação final ou remoção da pasta (S2). A contagem de CFU de anaeróbios mostrou que microrganismos estavam presentes em 100% das amostras em S1. Em S2, não foi detectado crescimento bacteriano em 88,6% das amostras para o grupo do EndoVac e em 78,28% para o grupo onde se utilizou a pasta triantibiótica, não havendo no entanto diferença estatisticamente significativa entre um e outro. A conclusão dos autores é de que o sistema EndoVac é uma alternativa promissora no tratamento de periodontite apical em dentes imaturos, apresentando redução bacteriana similar ou superior ao uso de medicação antibiótica intra canal, o que pode sobremaneira facilitar o protocolo de tratamento ao suprimir a necessidade do uso de curativo entre sessões.

Miller e Baumgartner (2010) voltaram a investigar o efeito da irrigação com o sistema EndoVac sobre *Enterococcus faecalis*, desta vez com foco na região apical e com objetivo de quantificar também os microrganismos presentes no interior dos túbulos dentinários e outras eventuais reentrâncias anatômicas. Para tal, utilizaram dentes extraídos, esterilizados e inoculados com *Enterococcus faecalis*. Os espécimes foram preparados variando somente a técnica de irrigação/aspiração (EndoVac ou seringa de liberação lateral). Os dentes tiveram os 5 mm finais seccionados, foram congelados em nitrogênio líquido e pulverizados para quantificar o número de CFU por mg de dentina. O grupo do sistema EndoVac apresentou uma média de 31,6 CFU/mg, enquanto que a irrigação com agulha teve média de 157 CFU/mg. Quando esses valores foram comparados aos encontrados no grupo controle positivo, observou-se uma redução de 99,7% e 98,8% para EndoVac e agulha, respectivamente. Apesar das diferenças encontradas entre os grupos experimentais, a análise estatística mostrou não haver significância, considerando ambas as técnicas equivalentes frente à metodologia empregada.

Shin et al. (2010) compararam a eficácia da limpeza proporcionada pelo sistema EndoVac e por duas agulhas de irrigação com calibres diferentes (24 e 30 Gauge) em 69 dentes apresentando um único canal, mas preparados até diâmetros apicais diversos (ISO #25, #40 e #60). Cortes seriados foram feitos a 1,5 e 3,5 mm a partir do ápice, corados, fotografados no microscópio óptico com aumento de 100 vezes e levados para análise em software. Nos dois níveis analisados, foram detectadas diferenças na remoção de debris entre o EndoVac e as agulhas de irrigação, com valores favoráveis ao primeiro. Além disso, a relação entre o aumento do diâmetro apical do preparo e a remoção de debris mostrou-se diretamente proporcional.

Brunson et al. (2010) buscaram avaliar o volume de solução que atinge a região apical quando se utiliza o sistema EndoVac, variando o diâmetro apical (ISO #30, #35, #40 ou #45) e a conicidade do preparo (ISO #40.02, .04, .06, .08). Quarenta dentes uniradiculares foram utilizados. Todos os espécimes foram irrigados com NaOCl e valendo-se da microcânula do sistema, que ficou posicionada no comprimento de trabalho durante 30 segundos. O volume de solução aspirada via microcânula foi coletado. O volume máximo aspirado via microcânula foi de 1,5 mL. Os resultados mostraram que um aumento de um calibre #35 para #40, possibilita em média que 44% a mais de solução alcance a região apical, enquanto que o

aumento de um calibre #40 para #45, resulta um acréscimo de 4% de volume de NaOCl no comprimento de trabalho. Com relação à conicidade, observou-se um aumento gradativo de volume quando se aumentou a conicidade de .02 para .08 (74%, 5,4% e 2,4% respectivamente). Os autores concluem que o aumento do diâmetro apical e da conicidade do preparo possibilitam a chegada de um volume maior de solução até o comprimento de trabalho, mas, considerando-se a necessidade de preservação de estrutura dental, um preparo até instrumentos #40.04 parecem bastante racionais para uma irrigação eficaz sem desgaste em excesso quando se trabalha com o sistema EndoVac.

Um novo estudo *in vivo* com dentes imaturos de cães foi realizado por Silva et al. (2010). Os autores dividiram oitenta canais em quatro grupos: irrigação com NaOCl 2,5% e EndoVac (Grupo 1), irrigação convencional e NaOCl 2,5% + medicação com pasta triantibiótica (metronidazol, ciprofloxacina e minoxiclina) por 14 dias (Grupo 2), dentes hígidos sem tratamento (Grupo 3) e dentes com periodontite apical induzida sem tratamento (Grupo 4). Os animais foram sacrificados após 90 dias. As características das regiões apical e periapical foram descritas, e escores atribuídos aos seguintes parâmetros histológicos: tecido mineralizado apical neoformado, infiltrado inflamatório periapical, espessura do ligamento periodontal apical, reabsorção dentinária e reabsorção de tecido ósseo. Embora diferença estatisticamente significativa tenha sido encontrada somente para o infiltrado inflamatório, de maneira geral, o Grupo 1 apresentou formações mineralizadas mais exuberantes, tecidos conectivos apicais e periapicais mais estruturados, e processo de reparo mais avançado que o Grupo 2.

Gregório et al. (2010) avaliaram a penetração de hipoclorito de sódio em canais laterais simulados e no comprimento de trabalho com diferentes sistemas de irrigação e ativação. Um total de 100 dentes uniradiculares foram utilizados neste estudo, cada um deles recebeu 6 perfurações que simulavam canais laterais. Os dentes foram vedados com cera para tornar o sistema fechado e receberam irrigação com solução de NaOCl 5,25% (90%) e contraste (10%), utilizando protocolo específico para cada grupo a seguir: EndoActivator, irrigação ultrassônica passiva (PUI), agitação com lima Flex, EndoVac e pressão positiva com seringa e agulha. Cada dente foi avaliado através de microscópio óptico clínico para observar a penetração da solução com contraste. Os resultados demonstraram que em 100% dos casos tratados com o EndoVac, observou-se solução nos limites do

comprimento de trabalho, enquanto nos outros grupos esse percentual variou entre 0% (pressão positiva) e 65% (PUI). Na análise dos canais laterais, pode-se observar superioridade da utilização de PUI, atingindo significativamente maior número de canais quando comparado aos outros protocolos.

De acordo com Gondim et al. (2010), o uso do dispositivo de pressão negativa, EndoVac, pode reduzir significativamente o desconforto pós operatório em pacientes submetidos ao tratamento endodôntico. Para chegarem a esta afirmação, realizaram um ensaio clínico prospectivo randomizado com 110 pacientes que possuíam dentes uniradiculares assintomáticos com necessidade de intervenção endodôntica. Após o tratamento, os pacientes receberam prescrição de ibuprofeno 200 mg, para ser administrado via oral a cada 8 horas, se necessário. Os níveis de dor e a quantidade de ibuprofeno que o paciente fez uso foram controlados nos seguintes tempos: 4, 24 e 48 horas após o tratamento. A dor pós operatória foi significativamente menor em todos os períodos quando os pacientes foram tratados com o auxílio do sistema EndoVac. Com relação ao uso de medicação, houve uma menor administração por parte dos pacientes nos quais foi utilizada pressão negativa, sendo estatisticamente significante em 4 e 24 horas e não havendo diferença em 48 horas. Os resultados podem ser atribuídos ao menor extravasamento com o uso do EndoVac.

Heilborn et al. (2010) voltaram a avaliar a capacidade de limpeza da região apical com EndoVac e irrigação convencional, desta vez, tendo também o tempo como fator de variação. Utilizaram para o estudo 50 dentes com canal único, preparados com instrumentos rotatórios e divididos em 3 grupos experimentais de acordo com o protocolo de irrigação final: EndoVac por 210 segundos (Grupo 1), EndoVac por 150 segundos (Grupo 2), pressão positiva com agulha e seringa por 210 segundos (Grupo 3). As soluções irrigadoras utilizadas foram o hipoclorito de sódio 6% e o EDTA 15%. A quantidade de debris foi quantificada em cada espécime a 3 mm e a 1 mm do comprimento de trabalho. Foram obtidos cortes corados em hematoxilina-eosina, fotografados em microscópio com aumento de cem vezes e levados para análise em software. A análise dos resultados mostrou de maneira geral não haver diferença estatisticamente significante entre a pressão positiva e negativa. Entretanto, nos grupos irrigados com o sistema EndoVac, 100% dos espécimes mostraram ausência de debris, independente do tempo de uso (210 ou 150 segundos) e da região avaliada (1 ou 3 mm do comprimento de trabalho). Para

a pressão positiva, a quantidade de espécimes onde foram encontrados debris foi de 73.3 e 86.7% respectivamente para 3 mm e 1 mm do comprimento de trabalho.

Parente et al. (2010) investigaram a influência em trabalhar com modelos de estudo *in vitro* abertos ou fechados. Para tal, utilizaram 40 dentes instrumentados da mesma maneira, divididos em 4 grupos experimentais: EndoVac ou agitação manual dinâmica, em sistemas aberto ou fechado. O selamento apical foi obtido utilizando cola quente no ápice e incluindo o dente em aparato de teflon preenchido com polivinilsiloxano. Todos os espécimes foram processados para análise em microscopia eletrônica de varredura em um aumento de 2000 vezes. A análise dos resultados revelou não haver diferenças entre os grupos onde se utilizou o EndoVac, tanto em sistema aberto quanto fechado, mas que eles apresentaram diferença do grupo no qual se utilizou pressão positiva em sistema fechado. Entre os grupos irrigados com pressão positiva, houve diferença estatística quando se trabalhou em sistema fechado ou aberto, com melhores resultados obtidos neste último. Desta forma, pode-se concluir que o uso de um sistema fechado, apesar de não influenciar nos resultados obtidos com o EndoVac, influenciou adversamente na qualidade da limpeza obtida com pressão positiva.

Siu e Baumgartner (2010) compararam a eficácia do debridamento com o sistema EndoVac ou irrigação convencional *in vivo*. Foram selecionados pacientes que possuíam dentes vitais com ápice completamente formado e indicação para extração. Cada grupo experimental foi composto de 22 dentes, com 5 dentes para o grupo controle positivo. Os dentes dos grupos experimentais foram instrumentados da mesma maneira, variando somente o protocolo de irrigação (EndoVac ou agulha e seringa). Após o preparo, os dentes foram extraídos, fixados e descalcificados. Cortes com espessura de 6 µm foram realizados a 1 mm e a 3 mm do comprimento de trabalho, e posteriormente corados. Os resultados mostraram que, a 1 mm do comprimento de trabalho, o EndoVac apresentou valores significativamente menores de debris, enquanto que, a 3 mm da mesma medida, os valores foram estatisticamente iguais.

Susin et al. (2010) selecionaram, através de microtomografia, 20 molares inferiores humanos que apresentavam istmo entre seus canais mesiais. O objetivo dos autores foi comparar a capacidade de limpeza do sistema EndoVac e da agitação manual dinâmica em canais radiculares e istmos em um sistema fechado. Foram realizados 10 cortes entre 1 e 2,8 mm de distância do ápice anatômico e suas

imagens em microscopia analisadas por software. Os resultados demonstraram que, nos canais, não houve diferença estatisticamente significativa entre os protocolos de irrigação em nenhum nível de corte. Para os istmos, em geral, houve diferença estatística significativa a favor do sistema EndoVac, sem que, no entanto, fossem observadas variações com relação ao nível do corte. Pode-se observar que nenhum dos protocolos foi efetivo na limpeza de istmos em raízes mesiais de molares inferiores, mas que o uso de pressão apical negativa removeu consideravelmente mais debris destas regiões.

Mitchell et al. (2010) observaram novamente, através de outra metodologia, a segurança do sistema EndoVac em evitar o extravasamento apical de solução para os tecidos de suporte. Neste estudo, os autores compararam o extravasamento apical entre o sistema de pressão apical negativa e seringa e agulha convencionais, variando também o diâmetro apical do preparo (ISO #40 ou #60). Foram utilizados 48 dentes uniradiculares, fixados em uma placa contendo gel de agarose com uma substância reagente às soluções irrigadoras. O gel foi fotografado por software e analisado em percentuais de pixels totais. Com o preparo apical em #40 a frequência de casos onde houve extravasamento foi de 50% para irrigação convencional (6/12) e 8,33% para o EndoVac (1/12). Quando o preparo foi ampliado para um diâmetro apical #60, chegou-se aos seguintes valores: 58,33% para irrigação convencional (7/12) e 8,33% para o EndoVac (1/12). A análise estatística mostrou haver diferença significativa entre o grupo convencional e o EndoVac, independente do diâmetro do preparo apical.

Quando Mitchell et al. (2011) compararam a quantidade de solução extravasada além dos limites do forame apical pelos sistemas EndoVac, EndoActivator e Rispi-Sonic acoplado ao contra-ângulo MicroMega 1500 (Medidenta International Inc, Woodside, NY). Observaram que a pressão apical negativa apresentou os menores índices de extravasamento, e que a quantidade extravasada com os outros sistemas está diretamente ligada ao diâmetro e conicidade do preparo.

No quesito remoção de *smear layer*, Abarajithan et al. (2011) voltaram a encontrar resultados favoráveis ao sistema EndoVac, quando comparado à irrigação convencional. Quando comparados em microscopia eletrônica de varredura, a diferença foi identificada somente no terço apical, sendo ambas as técnicas semelhantes nos terços médio e cervical.

Com este mesmo objetivo, Saber e Hashem (2011) compararam o grau de limpeza dos canais radiculares com diferentes protocolos de agitação final da solução: pressão apical negativa com o EndoVac, irrigação passiva, agitação manual dinâmica e irrigação ultrassônica passiva. Os menores índices de resíduos após o preparo e agitação foram obtidos pelo sistema EndoVac, seguido pela agitação manual dinâmica e depois as outras duas técnicas. Em todos os grupos a porção apical foi onde mais se encontrou resíduos, seguida pelo terço médio e cervical.

No entanto, quando comparou o nível de limpeza entre o sistema EndoVac, irrigação com Max-i-Probe ou PiezoFlow (ProUltra, Dentsply, Tulsa, OK), Howard et al. (2011) encontraram resultados semelhantes entre as 3 técnicas em todas as profundidades analisadas nos canais, quando utilizadas com volumes similares de substâncias químicas, tanto no terço apical como nas regiões de istmos.

O sistema EndoVac também parece funcionar bem na remoção de hidróxido de cálcio das paredes dentinárias. Yucel et al. (2011) compararam a técnica de pressão apical positiva com o ultra-som e a irrigação convencional, e observaram que ultra-som e EndoVac foram mais efetivos na eliminação do hidróxido de cálcio, sem diferença estatística entre um e outro, mas superiores à irrigação convencional.

Ribeiro et al. (2012) também avaliaram o grau de limpeza das paredes dentinárias através de microscopia eletrônica de varredura e concluíram que as técnicas que utilizam algum dispositivo, como o EndoVac ou ultra-som, foram mais efetivas que as técnicas manuais, mas que nenhuma técnica proporcionou paredes dentinárias totalmente livre de restos do preparo.

A utilização do sistema EndoVac durante os procedimentos de limpeza é mais comum entre os dentistas norte-americanos. Conforme Dutner et al. (2012) apresentaram nos resultados de uma pesquisa feita com mais de 3000 membros da associação americana de endodontia, metade dos profissionais utilizam algum tipo de mecanismo para potencializar a irrigação, com 10% deles trabalhando com pressão apical negativa.

O sistema de preparo de canais radiculares chamado Self Adjusting File (SAF) (Re-Dent-Nova, Ra'anana, Israel) surgiu como uma nova opção em descontaminação e limpeza, com uma cinemática diferente e a vantagem de possuir um sistema de irrigação acoplado. Com o objetivo de observar a penetração das

substâncias químicas auxiliares no comprimento de trabalho e em canais laterais e não instrumentados, Gregorio et al. (2012) compararam a SAF com EndoVac e outros sistemas de irrigação e observaram que apenas a pressão apical negativa foi capaz de levar a solução irrigadora até o limite do comprimento de trabalho, sendo que nenhum sistema foi efetivo na irrigação de canais laterais.

A capacidade de penetração da substância química auxiliar também foi avaliada *in vivo* por Munoz e Cuadra (2012), quando, após o preparo, utilizaram o sistema EndoVac, irrigação convencional e ultra-som para irrigar canais mesiais curvos de molares inferiores com uma substância radiopaca associada ao hipoclorito de sódio. Comprovaram que ultras-som e EndoVac foram mais efetivos que a irrigação convencional, mas iguais entre si. A distância média que a solução alcançou nestes dois grupos ficou a menos de 0,5 mm do comprimento de trabalho.

Pawar et al. (2012) compararam *in vivo* a capacidade do sistema EndoVac e da irrigação convencional em obter amostras das quais bactérias não puderam ser cultivadas. A análise dos resultados mostrou que as técnicas avaliadas foram semelhantes, não havendo diferença estatística entre elas. A frequência de culturas negativas foi de 90,9% e 82,6% para irrigação convencional e EndoVac, respectivamente.

2.4 MICROBIOLOGIA ENDODÔNTICA

A primeira suspeita da presença de microrganismos em canais radiculares remonta ao século XVII, quando o holandês Antony van Leeuwenhoek (1632-1723) misturou o conteúdo removido de canais radiculares à água limpa de chuva, observando “criaturas vivas” ao microscópio, às quais denominou “pequenos animalículos”. Suas descrições em desenhos lembram muito as formas hoje conhecidas: cocos, bastonetes e espiralados (van Leeuwenhoek, 1673).

O primeiro relato da identificação de microrganismos em canais radiculares data de 1894, quando Miller, considerado por muitos como o pai da microbiologia oral, mesmo com as limitações das técnicas de cultura disponíveis à época, observou a presença de cocos, bacilos e espiralados no espaço então ocupado por tecido pulpar necrótico em 50 dentes. Desde então, Miller já ressaltava que muitos

microrganismos presentes na infecção endodôntica eram difíceis de serem obtidos por cultura e que, portanto, dificilmente eram identificados.

MacDonald et al. (1957) ao identificarem bactérias em canais de dentes traumatizados que sofreram necrose pulpar, sugeriram a capacidade de bactérias alcançarem o sistema de canais radiculares também por vias hematogênicas, oriundas do periodonto.

Por um longo período, outros autores (Brown; Rudolph, 1957; Winkler; van Amerongen, 1959) passaram a identificar algumas espécies em canais radiculares com necrose do tecido pulpar. Entretanto, não se sabia ao certo quais os mecanismos de patogenicidade destes microrganismos e quais repercussões eles causavam nos tecidos adjacentes. A microbiota encontrada nestes trabalhos era composta somente por aeróbios e anaeróbios facultativos, muito em função das técnicas de cultivo à época serem limitadas, dificultando o isolamento e crescimento de microrganismos anaeróbios estritos.

Atenção maior vem sendo dada ao papel dos microrganismos como principais causadores das doenças da polpa e do periápice desde os anos 60, com o estudo clássico de Kakehashi et al. (1965) que demonstrou, através do trabalho com animais comuns e *germ-free*, a necessidade da presença de contaminação por microrganismos para o desenvolvimento de periapicopatias. Quando animais *germ-free* tinham suas polpas expostas ao meio bucal, os autores observaram que apenas uma resposta inflamatória mínima era desencadeada, com conseqüente cura. Já nos animais portadores de microbiota, estabeleceu-se uma infecção com necrose pulpar, abscesso e periodontite apical.

Durante os anos 70, a evolução das técnicas de cultivo para microrganismos anaeróbios permitiu aos pesquisadores identificarem espécies deste grupo nas lesões endodônticas. Bergenholtz (1974) investigou a presença de bactérias em 84 dentes uniradiculares que sofreram necrose em decorrência de um trauma dental, e encontrou cultura positiva em 64% das amostras. A microbiota encontrada foi do tipo mista, com uma média de 4,3 espécies isoladas em cada canal, caracterizada na sua maioria (78% ou n=171) por microrganismos anaeróbios estritos, pertencentes aos gêneros *Bacteroides* (n=62), *Peptostreptococcus* (n=27), *Fusobacterium* (n=26) e *Corynebacterium* (n=45).

Os resultados encontrados por Kakehashi em 1965 foram confirmados por Sundqvist (1976) em humanos, analisando o conteúdo coletado de canais

radiculares com necrose pulpar decorrentes de traumatismo dentário. Microrganismos foram identificados somente naqueles dentes portadores de lesão periapical. A não identificação de microrganismos nos dentes sem repercussões periapicais comprovou que somente o tecido pulpar necrótico não é capaz de desenvolver uma lesão periapical e, desta forma, dentes que apresentam este tipo de alteração, necessariamente estão infectados por microrganismos. Além disso, valendo-se da evolução das técnicas de cultura para anaeróbios, Sundqvist pode confirmar a predominância de anaeróbios estritos na microbiota de canais infectados com lesão periapical. Os resultados também forneceram algumas informações adicionais e não menos importantes: casos sintomáticos estavam relacionados com maior carga microbiana; o número de espécies por canal variou entre 1 e 12; quanto maior a lesão periapical, mais densa e complexa era a microbiota identificada.

Neste mesmo sentido, resultados semelhantes foram encontrados por Moller et al. (1981), pesquisando necrose pulpar séptica e não séptica induzidas em macacos, fortalecendo os achados de Kakehashi e Sundqvist, e sedimentando a relação causal entre microrganismos e as patologias pulpar e periapical.

Yoshida et al. (1987), ao analisarem a microbiota presente em 36 canais radiculares de dentes permanentes com presença de lesão periapical, observaram o predomínio de bactérias anaeróbias estritas, principalmente *Eubacterium* spp., *Actinomyces* spp., *Bacteroides* spp. e *Peptostreptococcus* spp., predominantemente "*Peptococcus magnus*". Espécies facultativas como "*S. faecalis*" e "*S. intermedius*" também foram isoladas. Os autores concluíram que diversas espécies bacterianas anaeróbias estritas e facultativas estão presentes na infecção dos canais radiculares, e que a presença de sintomatologia tem relação com um predomínio das espécies anaeróbias estritas.

Estas bactérias encontram-se sediadas principalmente na luz do canal e nas paredes dentinárias, ocorrendo também invasão para dentro dos túbulos dentinários. A forma de organização destas bactérias na luz do canal foi muito bem elucidada por Nair (1987), que comprovou em cortes seriados de dentes portadores de periodontite apical bacteriana, que elas não se encontram em forma de colônias únicas e isoladas, mas sim envolvidas em uma matriz extracelular em camadas, em forma de biofilme bacteriano multiespécie.

Outros autores, como Sundqvist et al. (1989) e Haapasalo (1989), apesar de trabalharem com metodologias diferentes, também encontraram predomínio de

bactérias anaeróbias estritas e de infecções do tipo mista na imensa maioria das amostras coletadas de canais infectados.

Ademais, Kobayashi et al. (1990) estudaram os microrganismos presentes em 15 infecções endodônticas estabelecidas em dentes com bolsas periodontais. Constataram maior prevalência de espécies anaeróbias estritas tanto no canal radicular quanto na bolsa periodontal, principalmente *Peptostreptococcus* spp., *Eubacterium* spp., *Bacteroides* spp. e *Fusobacterium* spp..

O processo pelo qual a infecção dos canais radiculares leva a reabsorção óssea periapical foi estudado e descrito na literatura ao longo dos anos, principalmente através de diversos estudos *in vivo* utilizando-se animais (Wang; Stashenko, 1991; Stashenko et al., 1992). Tal mecanismo envolve uma série de reações simultâneas, todas elas ligadas às respostas inflamatória e imunológica do hospedeiro, com o intuito de conter o avanço da infecção. O grau de extensão destas respostas está diretamente ligado às condições do organismo hospedeiro, e a fatores de virulência dos microrganismos, que podem ter ação direta ou indireta sobre os tecidos.

Sundqvist (1994) revisou as espécies mais frequentemente isoladas em canais radiculares infectados, concluindo que os anaeróbios estritos predominam em relação às espécies anaeróbias facultativas. *F. nucleatum* (48%), *Streptococcus* spp. (40%), *Bacteroides* spp. (35%), *P. micros* (34%), *P. intermedia* (34%), *Lactobacillus* spp. (32%), *P. anaerobius* (31%), *E. alactolyticum* (34%), *E. lentum* (31%). *Porphyromonas* spp. (9%) e *Actinomyces israelii* (11%) foram isolados nos respectivos percentuais.

Gomes et al. (1994) analisaram a microbiota de 30 canais radiculares com periodontite apical, podendo identificar cinquenta e sete diferentes espécies, sendo 60% destas, anaeróbias estritas, que estavam presentes em 96% dos casos sintomáticos e em 53% dos assintomáticos. Entre as espécies anaeróbias identificadas, as mais frequentes foram: *P. micros* (16,7%), *P. melaninogenica* (6,9%), *F. nucleatum* (6,9%) e *P. intermedia* (5,5%).

Em geral, os estudos de microbiologia em endodontia apontam que, dentre os principais microrganismos encontrados nas infecções dos canais radiculares, as bactérias anaeróbias Gram-negativas são as mais comumente identificadas, principalmente as anaeróbias estritas, e que algumas delas estão mais ou menos

associadas com a presença de sinais e sintomas clínicos (Sundqvist, 1976; Assed et al., 1996; Abou-Rass; Bogen, 1998).

Lana et al. (2001) investigaram os microrganismos presentes em 31 dentes uniradiculares portadores de necrose pulpar. O número médio de espécies isoladas em cada canal radicular foi de 5 espécies, variando entre 1 e 11. Infecção mista, polimicrobiana, foi identificada em 22 dos 27 casos estudados, num percentual de 81,5%. Bactérias anaeróbias estritas estavam presentes e foram isoladas em 24 (88,9%) amostras. Os gêneros mais frequentemente isolados foram: *Prevotella* spp., *Fusobacterium* spp., *Lactobacillus* spp., *Streptococcus* spp., *Clostridium* spp., e *Peptostreptococcus* spp..

O *Enterococcus faecalis* possui grande número de fatores de virulência, como por exemplo, a capacidade de regular o pH celular por uma espécie de bomba de prótons presente em sua membrana celular. São microrganismos capazes de sobreviver em ambientes inóspitos, tolerando alterações na temperatura, escassez de nutrientes e vivendo com ou sem a presença de oxigênio. Além disso, quando da organização em biofilmes, esta espécie encontra-se muito bem aderida à matriz extracelular, utilizando-se das demais espécies como um escudo protetor, o que dificulta sobremaneira sua eliminação. Na presença de soro humano, o *E. faecalis* tem a capacidade de aderir-se firmemente às fibras colágenas da matriz dentinária e ainda utilizá-las como fonte de nutrientes (Evans et al., 2002).

Jacinto et al. (2003) estudaram a microbiota de 70 dentes portadores de abscessos periapicais. Foram isoladas 69 diferentes espécies; sendo 83% dos microrganismos isolados anaeróbios estritos e 47,5% Gram-negativos. As infecções eram na sua maioria mistas, com no máximo 9 espécies por canal. Os microrganismos mais frequentemente isolados foram: *F. necrophorum*, *P. prevotti*, *P. micros*, *F. nucleatum*, *P. intermedia/nigrescens*, *G. morbillorum* e *Veillonella* spp..

Tang et al. (2004) analisaram, com auxílio de PCR convencional, amostras retiradas de 31 canais radiculares com infecção primária. Além dos procedimentos de preparo, limpeza e modelagem, foi utilizada medicação intracanal por 7 dias com hidróxido de cálcio ou septomixina. Nas amostras pós procedimentos de desinfecção, apenas 6 dos 31 casos foram negativos para a presença de DNA bacteriano, indicando que mesmo com este protocolo, microrganismos permanecem no canal radicular na maioria das vezes.

Com o advento das técnicas moleculares, Siqueira e Rôças (2005) puderam reconhecer mais de 700 espécies bacterianas que habitam a cavidade oral em humanos. Entretanto, mais de 50% dessas espécies ainda não foram isoladas. As principais vantagens dos métodos moleculares para estes autores são: detecção de espécies ainda não cultiváveis, alta especificidade e sensibilidade, detecção sem necessidade de cultivo, rapidez, independência da viabilidade bacteriana. Por outro lado, em função das desvantagens dos métodos moleculares, com resultados falso-positivos principalmente, há uma tendência dos pesquisadores em associar técnicas moleculares e de cultura na avaliação de suas amostras.

Mesmo com a evolução das técnicas de cultura e com o desenvolvimento da biologia molecular, as bactérias anaeróbias Gram-negativas continuam exercendo posição de destaque na infecção endodôntica (Gomes et al., 2004; Sassone et al., 2007; Vianna et al., 2008).

Com o conhecimento dos resultados obtidos com as técnicas moleculares de identificação, Martinho (2007) classifica as infecções endodônticas primárias como do tipo mistas e polimicrobianas, com predominância de microrganismos anaeróbios estritos, apresentando complexa interação microbiana entre as espécies. Ressalta as limitações dos métodos de cultura, que subestimam a microflora endodôntica. Neste sentido, o emprego dos métodos moleculares possibilitou o surgimento de uma nova era para o diagnóstico em microbiologia.

Ao compararem os métodos moleculares à cultura para identificação de *Enterococcus faecalis* em canais radiculares, Williams et al. (2006) chegaram a conclusão de que muitas vezes, esta bactéria resistente e frequente nas infecções endodônticas, era detectada por PCR em tempo real mas não apresentava crescimento pelas técnicas de cultura.

Estes achados em relação ao *E. faecalis*, foram comprovados por Sedgley et al. (2006), quando compararam os resultados de ensaios de isolamento em cultura e PCR quantitativo em 48 amostras de dentes infectados. Os meios de cultivo foram capazes de identificar esta espécie em 10,2% dos casos, enquanto por PCR em tempo real, em 79,5%.

Sakamoto et al. (2007) avaliaram através de PCR quantitativo em tempo real amostras retiradas de canais com infecção primária antes do preparo, após o preparo e após 7 dias de medicação com pasta de hidróxido de cálcio. Um total de 5 amostras das 15 avaliadas apresentou resultado negativo após preparo e após

medicação intracanal. O preparo químico mecânico reduziu em 99,67% a contaminação inicial, aumentando este percentual para 99,85% após os 7 dias com hidróxido de cálcio. Foram identificadas neste experimento 43 espécies bacterianas distintas, das quais, 56% pertencem a filotipos ainda não cultiváveis.

Também valendo-se da técnica de PCR quantitativo em tempo real, Blome et al. (2008) quantificaram o DNA bacteriano total em amostras obtidas de dentes portadores de periodontite apical crônica primária e secundária em três tempos: antes do preparo, após a realização do mesmo e após medicação intracanal com pasta de hidróxido de cálcio por 14 dias. A análise dos resultados mostrou que a carga bacteriana foi maior em infecções primárias e que o preparo químico mecânico possibilitou uma redução de no mínimo 95% da contaminação. Além disso, o uso da medicação intracanal não resultou em redução adicional significativa do total de bactérias.

A microflora endodôntica foi avaliada por Vianna et al. (2008) em três tempos: antes do preparo, após o preparo e após medicação intra-canal com hidróxido de cálcio por 7 dias. Para tal, foram utilizados os métodos de contagem de unidades formadoras de colônias e o Checkerboard DNA-DNA hybridization. Antes do preparo, as bactérias mais frequentes identificadas pela técnica molecular foram: *Fusobacterium nucleatum ssp. polymorphum*, *Treponema socranskii ssp. socranskii*, *Parvimonas micra* e *Enterococcus faecalis*. Após o preparo e a medicação intracanal, a única espécie Gram-positiva identificada foi o *Enterococcus faecalis*. A redução microbiana encontrada pela contagem de unidades formadoras de colônias foi de 99,96% após o preparo e não houve diferença estatística para a análise após o uso de medicação intracanal.

Jiang et al. (2009) utilizou PCR em tempo real para avaliar a efetividade dos procedimentos de desinfecção em canais radiculares com hipoclorito de sódio e água oxigenada. Observou que os procedimentos endodônticos foram capazes de reduzir drasticamente os níveis de DNA bacteriano e que, quando o EDTA é associado a tais substâncias químicas no preparo, o percentual de redução é ainda maior.

O advento das novas técnicas permitiu a identificação de patógenos que anteriormente não eram associados à infecção endodôntica, como as bactérias do chamado “complexo vermelho” (*P. gingivalis*, *Treponema denticola* e *Tannerella forsythia*), bastante associadas às infecções periodontais. Lopes e Siqueira (2010)

chegam a relatar uma prevalência destas espécies próxima aos 10% dos casos. Os mesmo autores também destacam que, apesar de encontrados eventualmente e em baixa quantidade, fungos e vírus são patógenos presentes em canais radiculares, principalmente *C. albicans*, citomegalovírus (HCMV) e vírus Epstein-Barr (EBV), e merecem atenção.

O alvo de estudo das técnicas moleculares, de acordo com Ferrari e Bombana (2010) é o gene 16S do RNA ribossomal, que está presente no DNA de todas as bactérias e contém diferentes regiões, algumas comuns a todas as espécies e outras variáveis, permitindo a caracterização entre elas ou não, dependendo do *primer* de escolha. A qualidade da análise, independente do método molecular, está intimamente relacionada à obtenção de ácidos nucleicos purificados nos procedimentos de extração. Nas reações de PCR, este ácido nucleico purificado passa por etapas de desnaturação, anelamento e extensão, e, quando se opta pelo PCR em tempo real, a mensuração dos produtos amplificados é contínua, à medida que a reação se processa. Existem dois sistemas comumente empregados nesta reação: o ensaio SYBR Green ou o sistema TaqMan.

Apesar das diferenças entre os sistemas SYBR Green e TaqMan, Vianna et al. (2006) constataram não haver diferença estatística entre ambos nas análises de amostras obtidas de infecções endodônticas primárias. Para chegarem a tal conclusão, os autores quantificaram *in vivo* a carga microbiana antes e após o preparo químico-mecânico em 32 canais radiculares de dentes humanos com polpa necrosada e presença de lesão periapical. As substâncias químicas utilizadas foram a clorexidina gel 2% e hipoclorito de sódio 2,5%. As análises foram feitas através da reação de polimerase em cadeia em tempo real (Realtime PCR) utilizando os dois diferentes experimentos (SYBRGreen e Taq Man). Além disso, as amostras também foram avaliadas pelo método tradicional de cultura. A redução de microrganismos foi acima de 96% para as duas substâncias utilizadas. A carga microbiana encontrada com o método de cultura foi abaixo daquela encontrada com o PCR. O hipoclorito de sódio apresentou maior capacidade de eliminar microrganismos presentes nestas situações quando comparado à clorexidina. Apesar de não ser estatisticamente significativa, o método TaqMan demonstrou ser mais sensível, principalmente nas amostras que apresentavam baixa concentração de células.

Da mesma forma, Rôças e Siqueira (2010) quantificaram as bactérias presentes em infecções endodônticas primárias nos mesmos três tempos: antes do

preparo, após o preparo e após o uso de medicação intra-canal através da metodologia do PCR em tempo real. Após o preparo, níveis detectáveis de RNA ribossomal bacteriano, que indicam viabilidade, foram encontrados em 60% dos casos, sendo que após o uso de medicação intra-canal, este percentual reduziu a 53%. Além disso, com os resultados obtidos por hibridização com *Checkerboard*, os autores puderam perceber que a terapia endodôntica foi capaz de reduzir substancialmente a diversidade da população microbiana encontrada. O uso das técnicas baseadas na identificação do RNA bacteriano, permite a identificação de bactérias viáveis mas não cultiváveis, que, apesar de não apresentarem crescimento em cultura, estão metabolicamente ativas.

Alves et al. (2012) quantificaram bactérias antes e após o preparo de canais com formato oval, que foram contaminados com *E. faecalis*. Os autores utilizaram cultura e PCR em tempo real e compararam as técnicas com instrumento recíproco único e com rotatório. Os resultados revelaram que, antes do preparo, os níveis de *E. faecalis* encontrados foram significativamente maiores com PCR em relação a cultura, enquanto que depois do preparo não houve diferença. As duas técnicas de preparo testadas foram eficazes em termos de redução da contaminação, atingindo valores médios acima de 99 %.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo desta pesquisa foi avaliar *in vivo* a redução de bactérias após o preparo químico mecânico com o auxílio do sistema EndoVac de irrigação e aspiração, em dentes portadores de periodontite apical primária, por meio da reação de PCR em tempo real.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 SELEÇÃO DOS PACIENTES

Após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (Protocolo 202/10, CAAE 0019.0.017.000-11/, Anexo A), foram selecionados através de anamnese, exame clínico e radiográfico, 20 pacientes que procuraram atendimento na rede pública de saúde dos municípios de Criciúma, Içara e Forquilha, todos em Santa Catarina. Os pacientes selecionados foram atendidos em consultório particular e atendiam os seguintes critérios de inclusão para o dente analisado:

- ✓ dente unirradicular com rizogênese completa e canal único;
- ✓ necrose pulpar confirmada por teste térmico de sensibilidade com gás refrigerante;
- ✓ diagnóstico de periodontite apical
- ✓ ausência de tratamento endodôntico prévio.

Foram excluídos os pacientes (ou dentes) que apresentaram ao menos um dos seguintes critérios:

- ✓ uso de antibiótico nos últimos três meses;
- ✓ presença de doenças sistêmicas;
- ✓ impossibilidade de isolamento absoluto;
- ✓ presença de bolsa periodontal maior que 3 mm;
- ✓ presença de trincas ou fraturas visíveis;

Todos os pacientes assinaram termo de consentimento livre e esclarecido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo e tiveram seus tratamentos devidamente finalizados com obturação e restauração do dente após as coletas para a pesquisa.

A divisão em dois grupos experimentais foi realizada aleatoriamente por sorteio.

4.2 ESTERILIZAÇÃO E CUIDADOS COM ASSEPSIA

Todos os materiais e instrumentais utilizados para este experimento foram esterilizados em autoclave. A antissepsia do ambiente operatório foi realizada com a fricção de álcool 70% e utilização de invólucros descartáveis nas áreas tocadas pelo operador. Tanto auxiliar como operador fizeram uso de equipamento de proteção individual descartável durante todos os procedimentos.

4.3 PROCEDIMENTOS CLÍNICOS INICIAIS E PRIMEIRA COLETA

Todos os procedimentos foram realizados por um único operador, especialista em endodontia, tomando todos os cuidados para manutenção da cadeia asséptica durante o tratamento e coleta das amostras.

No início do atendimento, o dente em questão era limpo com pasta profilática e escova de Robinson acionada por contra-ângulo em baixa velocidade.

Os pacientes receberam anestesia de acordo com a região que se encontrava o dente e de acordo com suas condições de saúde avaliadas durante a anamnese.

Foi feita instalação de isolamento absoluto envolvendo apenas o dente em questão com grampo e dique de borracha. A antissepsia do campo operatório foi feita com Swabs esterilizados embebidos em peróxido de hidrogênio 30% durante 30s, seguido por solução de hipoclorito de sódio 2,5% por mais 30s e finalmente solução de tiosulfato de sódio 5% por 1 minuto para neutralização do hipoclorito de sódio.

A seguir, o acesso à cavidade foi feito com broca diamantada esterilizada (Kg Sorensen) de tamanho compatível com a câmara pulpar, de acordo com a radiografia pré-operatória. Todo o procedimento de abertura foi realizado sem uso do spray da caneta de alta rotação, irrigando-se apenas com solução fisiológica esterilizada. Momentos antes da trepanação da câmara pulpar, realizou-se nova antissepsia do campo e posterior checagem da esterilização. A checagem da esterilização foi feita com 1 bolinha de algodão esterilizada esfregada durante um

minuto sobre a superfície dental a ser acessada endodonticamente. Imediatamente ela foi transferida para um frasco contendo caldo BHI e incubada a 37°C por 48 horas. Qualquer amostra que apresentava turvamento do meio era descartada da pesquisa e substituída por outra.

Terminada a cirurgia de acesso, o canal era então inundado com solução salina esterilizada e o dente permanecia assim por 1 minuto. Imediatamente após este tempo era coletada a primeira amostra (S1). Quatro cones de papel absorvente esterilizados eram inseridos no canal radicular até o comprimento de trabalho aparente e transferidos para um tubo do tipo eppendorf contendo RNA later (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Os tubos contendo RNA later foram imediatamente congelados em freezer -20°C e transportados em gelo seco para o laboratório para posterior avaliação pela técnica molecular de PCR em tempo real. As reações de PCR em tempo real foram realizadas no laboratório de Microbiologia Oral do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

4.4 PREPARO DO CANAL E SEGUNDA COLETA

Para o preparo do canal, os espécimes seguiram o mesmo protocolo. Inicialmente foi feita neutralização do conteúdo séptico/necrótico do canal com 5 mL de hipoclorito de sódio 2,5%.

Foi introduzida lentamente uma lima #10 Tipo K (Dentsply/Maillefer, Ballaigues, Suíça) a 3 mm do comprimento aparente do dente na radiografia de diagnóstico para exploração do canal. A medida do comprimento de trabalho foi determinada com auxílio de localizador foraminal Root ZX (J. Morita Mfg. Corp., Kyoto, Japão), levando o instrumento endodôntico até que o visor indicasse que foi alcançada a região do periápice. A partir deste ponto o instrumento foi recuado até que o visor marcasse a distância de 0,5 mm do forame, e esta medida foi utilizada durante a fase de preparo. Todos os espécimes foram instrumentados pelo sistema rotatório ProTaper Universal (Dentsply/Maillefer, Ballaigues, Suíça) acionados por motor elétrico a 300 rpm e 2 N.cm de torque. O preparo foi finalizado após o uso do instrumento F5 (ISO #50, conicidade .05 nos primeiros mm) no comprimento de

trabalho. Entre cada instrumento do sistema, era confirmada a patência do canal com lima #10 Tipo K.

A divisão dos grupos foi feita aleatoriamente por sorteio de acordo com a técnica utilizada para irrigação:

Grupo A (n=10): irrigação manual convencional. Neste grupo, entre cada instrumento utilizado foi feita irrigação com 5 mL de hipoclorito de sódio 2,5% valendo-se de seringa para irrigação (Ultradent Product Inc., USA) e agulha para irrigação 30G (Ultradent Product Inc., USA). A agulha era posicionada a 3 mm do comprimento de trabalho e leves movimentos de vai-e-vem se repetiam até que fossem dispensados os 5 mL da seringa. Para aspiração, pontas WhiteMac (Ultradent Product Inc., USA) montadas em intermediário plástico (Ultradent Product Inc., USA) e acionadas por bomba a vácuo eram posicionadas na entrada do canal. Ao término do preparo, após o instrumento F5, era utilizado para irrigação final EDTA-T 17%, o qual permanecia sem agitação no canal por 3 minutos, sendo renovado a cada 60 segundos. O volume total utilizado foi 5 mL. Na sequência, o mesmo volume de hipoclorito de sódio 2,5% foi utilizado pelos mesmos 3 minutos com renovação a cada 60 segundos.

Grupo B (n=10): irrigação com o sistema EndoVac (Discus Dental, Culver City, CA, USA) . Para este grupo, a irrigação foi feita entre cada instrumento com a ponta de liberação/evacuação do sistema EndoVac (Figura 1). A ponta foi posicionada na câmara pulpar, onde eram dispensados 5 mL de hipoclorito de sódio 2,5%. A própria ação do instrumento se encarregava de levar a solução até o interior do canal radicular. A irrigação final para estes dentes foi composta por 1 ciclo da macro irrigação e 3 ciclos da micro irrigação. Na macro irrigação, a ponta de liberação/evacuação do sistema foi posicionada na entrada do canal, dispensando 5 mL de hipoclorito de sódio 2,5% e aspirando o excesso. Enquanto isso, a macro cânula do sistema (Figura 2) foi deslizada até um ponto onde encontrava travamento e, deste ponto para cima, movimentos leves de vai e vem se repetiram. A macro irrigação durou 30 segundos e está exemplificada na Figura 3.. Para cada ciclo de micro irrigação, novamente a ponta de liberação/evacuação permanecia na entrada do canal liberando e aspirando o excesso de solução, enquanto a micro cânula do sistema (Figura 4) era posicionada na medida do comprimento de trabalho para o início do ciclo. A micro cânula permaneceu 6 segundos no comprimento de trabalho, logo após foi recuada em 2 mm, onde permaneceu por mais 6 segundos, avançando

novamente para o comprimento de trabalho por outros 6 segundos e assim sucessivamente até completar 30 segundos. A micro irrigação está exemplificada na Figura 5. Para o primeiro e terceiro ciclos da micro irrigação, a solução utilizada foi o hipoclorito de sódio 2,5%. No segundo ciclo da micro irrigação, a solução utilizada foi o EDTA-T 17% (Fórmula e Ação, São Paulo – SP). Ao final do segundo e terceiro ciclo da microirrigação, as respectivas soluções permaneceram nos canais por 3 minutos, com renovação a cada 60 segundos.



Figura 1 – Ponta de irrigação e aspiração simultânea do sistema EndoVac



Figura 2 – Detalhe da macrocânula do sistema EndoVac



Figura 3 - Figura ilustrativa da macro cânula do sistema EndoVac em funcionamento

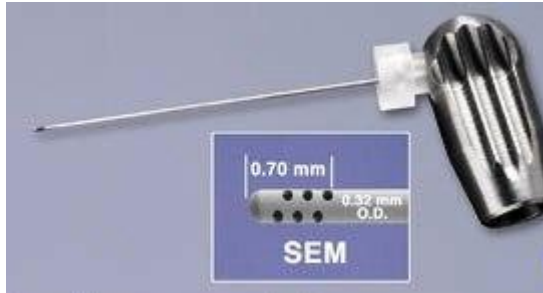


Figura 4 - Micro cânula do sistema EndoVac com detalhe das perfurações no término do dispositivo



Figura 5 - Figura ilustrativa da micro cânula do sistema EndoVac em funcionamento

O volume total de hipoclorito de sódio utilizado foi de 60 mL, independente da técnica.

Após preparo do canal, em todos os grupos, o mesmo permaneceu preenchido com solução de tiosulfato de sódio 5% (Fórmula e Ação, São Paulo – SP) por 1 minuto (5mL) para inativação do hipoclorito residual e, na sequência foi feita irrigação/apiração com 5 mL de solução fisiológica e realizada a segunda coleta (S2), como descrita anteriormente. Todos os dentes foram obturados na mesma sessão, pela técnica híbrida de Tagger, com cimento Sealer 26 (Dentsply/Maillefer, Ballaigues, Suíça). O selamento coronário foi realizado com cimento de ionômero de vidro e, posteriormente, os dentes restaurados com resina composta.

4.5 PCR EM TEMPO REAL

As amostras endodônticas mantidas em RNA later foram descongeladas a 37°C por 10 min e homogeneizadas por agitação em vortex durante 1 min. A extração de DNA foi realizada com o kit MasterPure de purificação de RNA/DNA (Epicentre, Madison, WI, USA) de acordo com as recomendações do fabricante (Figura 6).



Figura 6 - Kit MasterPure de purificação de RNA/DNA (Epicentre, Madison, WI, USA)

As reações de PCR em tempo real foram realizadas com primers universais para a região 16S rRNA, domínio *Bacteria*: 5'-CCA TGA AGT CGG AAT CGC TAG- 3' e 5'-GCT TGA CGG GCG GTG T- 3' (Shelburne et al. 2000) . As reações foram realizadas em placas de 96 poços com um volume total de 20 µL contendo: 10 µL SYBR Green Power Master Mix (Invitrogen, Carlsbad, CA) (Figura 7), 4 µL do DNA das amostras e 300nM de cada primer + água.



Figura 7 – SYBR Green Power Master Mix (Invitrogen, Carlsbad, CA)

O ciclo de amplificação analisado foi: 95°C por 10 min, seguido por 40 ciclos de denaturação a 95°C por 15 s, anelamento a 60°C por 1 min e extensão a 95°C por 15 s. Foi realizada curva de Melt para confirmar que o produto de PCR das amostras e da curva padrão possuíam pontos idênticos de melt. As reações foram feitas utilizando o termociclador Step One Plus (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e os resultados analisados pelo software ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) (Figura 8). Todas as amostras foram corridas em duplicata, utilizando-se para análise o valor médio entre ambas.

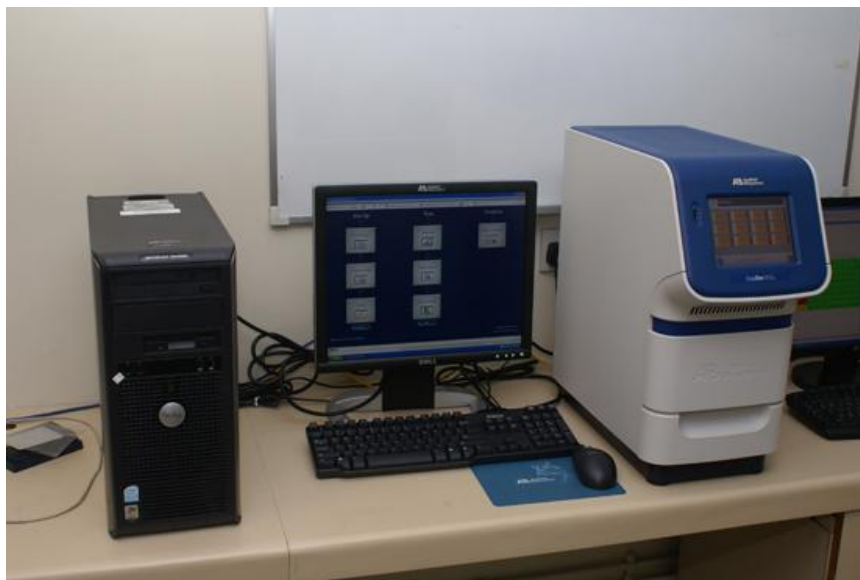


Figura 8 - Termociclador Step One Plus (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) conectado ao computador com o software ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)

Para a realização da curva padrão, foram utilizadas diluições de concentrações conhecidas de plasmídeos que continham o gene 16SrRNA de *A. actinomycetemcomitans*, clonados após reação de PCR convencional. As diluições utilizadas variaram de 10 a 10⁷ cópias de DNA. Cada concentração foi testada em triplicata para obtenção da curva com a maior eficiência e coerência possível.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram transcritos em tabelas para avaliação. A análise estatística dos resultados foi realizada com auxílio do software InStat GraphPad (GraphPad software Inc., La Jolla, CA, USA).

5 RESULTADOS

O método de desinfecção do campo operatório pode ser considerado adequado, uma vez que nenhuma das amostras obtidas antes da cirurgia de acesso apresentou turvamento quando imersas em BHI.

Em todas as 20 amostras obtidas antes do preparo foram identificadas cópias do gene 16SrRNA. Nas amostras pós-preparo, em apenas 1 dos casos não houve amplificação do DNA acima dos limites de sensibilidade do método, que foi de 10^3 .

Os valores encontrados em cada caso, para os grupos A e B, com seus respectivos percentuais de redução estão expressos nas tabelas 1 e 2.

Os valores encontrados antes do preparo para os dois grupos variaram de $7,2 \times 10^5$ a $1,0 \times 10^9$, com uma média de $1,6 \times 10^8$. Após o preparo, os valores foram de $1,8 \times 10^4$ a $1,8 \times 10^6$, com média de $8,8 \times 10^5$. O percentual de redução considerando todas as amostras foi de 97,52%.

Para o grupo A (irrigação convencional), os números antes do preparo variaram de $7,2 \times 10^5$ a $1,0 \times 10^9$, com média de $2,0 \times 10^8$. Após o preparo, estes valores foram de $1,8 \times 10^4$ a $1,8 \times 10^6$, com média de $5,5 \times 10^5$. A redução média encontrada neste grupo foi de 97,02%.

Para o grupo B (irrigação com auxílio do sistema EndoVac), os números antes do preparo variaram de $1,6 \times 10^6$ a $4,1 \times 10^8$, com média de $1,1 \times 10^8$. Após o preparo, estes valores foram de $5,8 \times 10^4$ a $7,1 \times 10^6$, com média de $1,2 \times 10^6$. A redução média encontrada neste grupo foi de 98,04%.

A análise estatística, feita com auxílio do software InStat GraphPad, revelou que os dados tiveram distribuição anormal, sendo utilizado um teste não paramétrico (Mann-Whitney) para análise da média dos dois grupos independentes. Após o preparo químico mecânico, observou-se uma significativa redução no número de microrganismos em todas as amostras de ambos os grupos experimentais ($p < 0,0001$). Para análise entre os grupos, não foi observada nenhuma diferença estatisticamente significativa ($p = 0,9705$). Isto representa que as duas técnicas de irrigação, convencional e EndoVac, apresentaram eficácia semelhante na redução bacteriana.

Tabela 1 – Resultados EndoVac. Carga microbiana (expressa em números de cópias de 16S rRNA) e porcentagem de redução determinada em 10 dentes humanos, portadores de periodontite apical primária, antes e após o PQM (preparo químico mecânico) com irrigação com o sistema EndoVac

Amostra (EndoVac)	Antes PQC	Após PQC	% Redução
1	5.9×10^7	5.5×10^5	99.06%
2	3.1×10^7	5.8×10^4	99.81%
3	1.0×10^7	6.7×10^4	99.35%
4	1.6×10^6	0.0	100.00%
5	4.5×10^7	4.0×10^5	99.11%
6	2.6×10^8	7.1×10^5	99.73%
7	4.1×10^8	7.8×10^5	99.81%
8	2.1×10^7	2.1×10^6	89.86%
9	2.1×10^8	1.9×10^5	99.91%
10	1.1×10^8	7.1×10^6	93.74%
Média	1.1×10^8	1.2×10^6	98.04%

Tabela 2 – Resultados Convencional. Carga microbiana (expressa em números de cópias de 16S rRNA) e porcentagem de redução determinada em 10 dentes humanos, portadores de periodontite apical primária, antes e após o PQM (preparo químico mecânico) com irrigação convencional

Amostra (Convencional)	Antes PQC	Após PQC	% Redução
1	6.2×10^8	1.8×10^6	99.71%
2	1.3×10^8	2.0×10^4	99.98%
3	1.0×10^9	1.8×10^4	99.99%
4	2.2×10^7	3.2×10^5	98.53%
5	4.9×10^6	9.0×10^4	98.17%
6	3.3×10^7	1.5×10^6	95.32%
7	2.5×10^7	1.1×10^6	95.42%
8	1.2×10^8	2.9×10^5	99.76%
9	4.5×10^7	7.9×10^4	99.82%
10	7.2×10^5	1.2×10^5	83.44%
Média	2.0×10^8	5.5×10^5	97.02%

6 DISCUSSÃO

A endodontia é uma especialidade da odontologia que exige do profissional que a exerce muita atenção aos detalhes, uma capacidade de concentração enorme e paciência para lidar com os obstáculos que o tratamento venha a apresentar. Cada etapa deve ser realizada com o maior critério, para que não comprometa o próximo passo na terapia. Sendo assim, não é possível apontar uma etapa mais ou menos importante que a outra, pois todas elas estão interligadas e se completam (Simi Junior et al., 1999; Soares; Goldberg, 2001).

O tratamento adequado visa o controle da inflamação e da microbiota, favorecendo e dando condições para o organismo proceder a cura e o reparo, além de modelar um formato adequado que facilite a obturação do sistema de canais (Moura, 1985; Prokopowitsch, 1988; Aun, 1990; Paiva; Antoniazzi, 1991). Entretanto, acidentes e insucessos fazem parte da clínica endodôntica em situações eventuais, e em grande parte das vezes, estão ligados a permanência de microrganismos no interior da microanatomia do sistema de canais radiculares.

O papel dos microrganismos, como agentes etiológicos das periodontites apicais, foi estudado ao longo de séculos, com as limitações e avanços pertinentes a cada época. Desde as pesquisas mais antigas como a de van Leeuwenhoek (1673) já se desconfiava da presença de microrganismos em canais infectados, mas os conhecimentos e tecnologias da época não permitiam a construção de uma teoria mais aprofundada sobre como se dava a etiopatogenia da infecção pulpar e periapical, que só foi posteriormente esclarecida a partir dos trabalhos do final dos anos 80 e início dos anos 90 (Wang; Stashenko, 1991; Stashenko et al., 1992)

Quando Miller (1894), considerado por muitos como pai da microbiologia oral, conseguiu isolar e identificar microrganismos a partir de coletas de canais infectados, o próprio autor já ressaltava as dificuldades em manter estas bactérias viáveis e cultiváveis após a coleta, pois as condições de sobrevivência no interior de canais radiculares são extremamente particulares.

Esta mesma dificuldade foi encontrada por outros autores nas décadas seguintes, quando conseguiam identificar em seus estudos somente bactérias aeróbias ou anaeróbias facultativas (MacDonald et al., 1957; Brown; Rudolph, 1957; Winkler; van Amerongen, 1959). Na realidade, outras espécies também estavam

presentes, mas não sobreviviam às condições de isolamento e crescimento disponíveis.

O simples fato de bactérias estarem presentes em infecções pulpares não as tornavam necessariamente agentes etiológicos, pois poderiam ser oportunistas após o desenvolvimento da patologia. Entretanto, o estudo de Kakehashi et al. (1965) deu definitivamente aos microrganismos o status de desencadeadores principais das periodontites apicais, fato este que foi comprovado por exemplo, por Sundqvist (1976) e Moller et al. (1981), provando que lesões periapicais desenvolvem-se somente na presença de contaminação.

As técnicas de cultura, mesmo com suas limitações, foram evoluindo ao longo do tempo, principalmente a partir da década de 70, com o aparecimento de técnicas que permitiam o cultivo também de anaeróbios. Os estudos a partir daí passaram a identificar espécies até então nunca isoladas dos canais radiculares. A partir destas técnicas, passou-se a conhecer a infecção endodôntica como uma infecção mista (média de 5 espécies por canal, podendo encontrar até 11), causada normalmente por um conjunto de espécies, principalmente anaeróbias Gram-negativas, dentre as quais se destacam *Streptococcus* spp., *Bacteroides* spp., *P. micros*, *F. nucleatum*, *Porphyromonas* spp. e *Actinomyces* spp. (Bergenholtz, 1974; Yoshida et al., 1987; Sundqvist et al., 1989; Haapasalo, 1989; Kobayashi et al., 1990; Sundqvist, 1994; Gomes et al., 1994; Assed et al., 1996; Abou-Rass; Bogen, 1998; Lana et al., 2001; Jacinto et al., 2003).

O surgimento das técnicas moleculares significou um avanço de proporções inestimáveis às pesquisas em microbiologia. O advento destas novas técnicas permitiu a identificação de patógenos até então desconhecidos, e acabou ampliando as possibilidades de pesquisas para compreensão dos fenômenos patológicos. Bactérias antes jamais isoladas e cultivadas passaram a ser encontradas e quantificadas em diferentes situações, de forma mais rápida e precisa (Siqueira; Roças, 2005; Ferrari; Bombana, 2010).

Algumas mudanças interessantes foram postuladas com relação a microbiologia endodôntica após a introdução das técnicas moleculares. Bactérias que anteriormente não tinham grande importância para os endodontistas passaram a ser encontradas com maior frequência, como o caso das bactérias do chamado complexo vermelho da periodontia (Lopes; Siqueira, 2010). Além disso, observou-se que a quantidade e a variedade de espécies encontradas concomitantemente em

um único caso estava subestimada com as técnicas de cultura, abrindo espaço para o estudo de outros tipos de interações entre as espécies (Martinho, 2007).

Apesar da evolução e das diferenças, mesmo com as técnicas moleculares, as bactérias anaeróbias Gram-negativas continuam exercendo posição de destaque na infecção endodôntica (Gomes et al., 2004; Sassone et al., 2007; Vianna et al., 2008).

O *E. faecalis*, que raramente era identificado em infecções primárias pelas técnicas de cultura, por longa data esteve mais associado a casos de infecções secundárias. Com o uso da biologia molecular, passou-se a identificar esta espécie com maior frequência e também quantidade, assumindo um papel de destaque também na infecção primária (Williams et al., 2006; Sedgley et al., 2006; Alves et al., 2012). A grande preocupação com o *E. faecalis* na infecção endodôntica justifica-se em função da resistência e da capacidade de adaptação desta espécie, capaz de desenvolver mecanismos de defesa e de manter-se viável por longo período de tempo mesmo em condições inóspitas a sua sobrevivência (Evans et al., 2002).

Apesar de as principais vantagens das técnicas moleculares serem a rapidez e a sensibilidade, estas podem tornar-se desvantagens em algumas situações. A alta sensibilidade torna difícil e cuidadosa a manipulação de todo o material, sendo que contaminações externas ocorrem com extrema facilidade e podem comprometer o êxito da pesquisa. Estas contaminações podem ser oriundas inclusive de componentes da própria reação de PCR em tempo real. Tudo isso pode fazer com que o tempo para que se alcance um protocolo ideal, com materiais adequados e técnica apurada seja muito grande, em algumas situações, mais trabalhoso inclusive do que as técnicas de cultura.

Um dos principais problemas encontrados na padronização da reação para este trabalho foi com a contaminação presente no SYBR mix de diferentes empresas. A obtenção desta substância é feita por um processo que utiliza *E. coli*, e, mesmo que seja posteriormente purificado, restos do DNA deste microrganismo estão presentes no conteúdo final. Isto é facilmente contornado quando o objetivo é encontrar espécies específicas que não tenham genes em comum com a *E. coli*. Entretanto, quando o objetivo foi quantificar DNA bacteriano em geral, com *primers* universais, não foi possível realizar um controle negativo, pois sempre havia alguma quantidade de DNA amplificado na reação. Este valor precisou ser subtraído de todas as amostras avaliadas, o que tornou a sensibilidade do método um pouco

menor (10^3). Esta mesma dificuldade foi encontrada por outros autores que utilizaram a mesma metodologia. Apesar da razão não estar explícita na redação final, Vianna et al. (2006) enfatizam que a sensibilidade do método foi de 10^2 , o que pode ser justificado pela mesma razão aqui discutida.

Se os microrganismos permanecessem na luz do canal principal, em colônias isoladas, sem dúvida alguma os procedimentos de desinfecção, independente da técnica, seriam capazes de erradicar a infecção por completo. O grande problema reside no fato de as bactérias normalmente invadirem todas as reentrâncias e organizarem-se na forma de biofilmes, como bem elucidada Nair (1987). Esta forma de organização dificulta os procedimentos de limpeza, pois muitas vezes as espécies mais resistentes estão alojadas no interior desta matriz que organiza o biofilme, ou até mesmo usando outras espécies como escudo ou “soldados”. Desta forma, a substância química por si só não é capaz de desestruturar este emaranhado, precisando da ação mecânica dos instrumentos ou da energização do fluxo por algum tipo de dispositivo.

Outro fator que dificulta a limpeza e desinfecção é a complexidade anatômica que os sistemas de canais radiculares podem apresentar (Baratto-Filho et al., 2004). Este é, sem dúvida alguma, o principal obstáculo enfrentado pelo clínico, pois além de complexo, há pouca luz e visibilidade. A utilização de aparelhos de microscópio, por exemplo, é uma saída para driblar e ao menos amenizar este fator. Na presente pesquisa, optou-se por trabalhar em dentes uniradiculares, com anatomias mais amplas e menos complexas, que passaram por análise prévia através de radiografia periapical. Desta forma, buscou-se minimizar este obstáculo.

Os conceitos de limpeza e modelagem durante o preparo químico mecânico, como propostos por Schilder (1974) são aceitos até os dias atuais, e responsáveis por eliminar os restos teciduais, microrganismos e seus bioproductos. A ação de corte dos instrumentos é limitada, conforme mostrou Goldman et al. (1981), e em razão disso, precisa ser associada aos benefícios de substâncias químicas auxiliares: favorecimento do corte, prevenção de acúmulo de debris, remoção ou dissolução de material orgânico e necrótico, eliminação de bactérias e seus bioproductos (Luebke, 1967; Goldman et al., 1976).

Tal associação, não é capaz de impedir por completo, mas minimiza o acúmulo e favorece a remoção da *smear layer*, camada que pode abrigar ou

proteger patógenos da ação de antimicrobianos (Ciucchi et al., 1989; Gavini et al., 1994).

O preparo com instrumentos rotatórios, sem dúvida alguma, favorece a limpeza e modelagem dos canais, mas comprovadamente também gera maior quantidade de detritos. Estes detritos, por razões físicas, mecânicas e anatômicas, tendem a se acumular em maior quantidade na porção apical dos condutos, como mostraram diversos trabalhos aqui revisados (Holland et al., 1990; Lopes et al., 1996; Ciucchi et al., 1989; Khademi; Feizianfard 2004; Nielsen; Baumgartner, 2007).

Na tentativa de alcançar um grau de limpeza adequado desta zona crítica apical, há o risco de extravasamento de substâncias químicas além dos limites do forame, gerando reações indesejáveis que são frequentemente relatadas na literatura (Masillamoni et al., 1981; Çaliskan et al., 1994; Hülsmann; Hahn, 2000; Gernhardt et al., 2004; Spencer et al., 2007).

A meta é alcançar uma profundidade adequada com a irrigação sem riscos de extravasamento de substância pelo forame. Para isso, parece mais lógico utilizar uma agulha de pequeno calibre, que poderia alcançar a delgada região apical. No entanto, agulhas de pequeno calibre, tendem a causar uma pressão maior no interior da seringa, aumentando assim o risco de extravasamento (Boutsioukis et al., 2007; Schoeffel, 2007). Neste sentido, algumas agulhas com perfurações laterais, ou outros tipos de design, possibilitam uma menor pressão de liberação em direção ao ápice, mas não resolvem por completo o problema.

A pressão e a capacidade da solução atingir o comprimento de trabalho, de acordo com resultados vistos na literatura, também estão relacionadas com os seguintes fatores: diâmetro e a conicidade dos condutos, profundidade na qual a ponta da agulha é posicionada e a pressão que se exerce no êmbolo (Hsieh et al., 2007; Hockett et al., 2008; Brunson et al., 2010; Mitchell et al., 2010; Shin et al., 2010; Mitchell et al., 2011).

O sistema EndoVac surge neste sentido como uma alternativa para uma irrigação efetiva e segura da região apical, a partir da ideia e dos resultados obtidos por Fukumoto et al. (2006). Ao inverter o fluxo, o sistema gera uma pressão negativa que faz com que a solução irrigadora faça um caminho inverso, com condições de alcançar e limpar até os limites do comprimento de trabalho sem pressão e com baixo risco de extravasamento (Nielsen; Baumgartner, 2007; Schoeffel, 2007; Schoeffel, 2008a,b; Schoeffel, 2009).

Sem dúvida alguma, a segurança é o ponto chave do sistema EndoVac. Todos os trabalhos que avaliam extravasamento apical, que utilizaram diferentes metodologias, são unânimes em afirmar que a pressão apical negativa permite um extravasamento apical consideravelmente baixo ou inexistente, independente do sistema ao qual se compara (Desai; van Himel, 2009; Mitchell et al., 2010; Mitchell et al., 2011).

O menor extravasamento justifica a indicação de Trope (2006), que sugere a utilização do sistema EndoVac em casos de formação radicular incompleta ou reabsorções, podendo ser inclusive uma alternativa em substituição a medicação intracanal para casos de revascularização pulpar em dentes imaturos necrosados, conforme mostrou o trabalho de Cohenca et al. (2010).

Além disso, o fato de extravasar menos agentes irritantes para o periápice ajuda a explicar os resultados de diminuição da dor pós-operatória em pacientes tratados com auxílio de pressão apical negativa, como mostrou o trabalho de Gondim et al. (2010). Irritando menos e limpando melhor, melhoram as condições histológicas no periápice, como visto nos resultados de Silva et al. (2010).

O fluxo hidrodinâmico é de extrema importância para “lavar” os debris e patógenos, e é diretamente afetado quando se trabalha em sistemas abertos ou fechados. Muitos dos trabalhos que avaliam grau de limpeza e desinfecção desconsideram esta condição, sendo difícil transpor estes resultados para a prática clínica, pois sistemas fechados dificultam a limpeza. Isto se justifica pela formação de bolhas de ar, como explicaram Schoeffel (2008a) e Vera et al. (2012). Segundo os autores, o diâmetro reduzido dos canais, faz com que haja a formação de bolhas em seu interior, principalmente nos terços médio e apical. Estas bolhas, por sua vez, impedem o contato direto das soluções irrigadores com as paredes dentinárias, prejudicando a limpeza e desinfecção.

O sistema EndoVac, por ser capaz de aspirar este ar que se acumula, cria condições para que a substância química utilizada atinja toda extensão do canal radicular, tocando o máximo de paredes possíveis até o comprimento de trabalho (Parente et al., 2010).

A melhora do fluxo hidrodinâmico com o uso do sistema EndoVac, nos faz imaginar que a solução tenha energia suficiente para alcançar regiões anatômicas mais complicadas. Alguns pesquisadores investigaram esta condição, e constataram que o uso da pressão apical negativa favorece a chegada de substância química em

canais com ramificações (Gondim et al., 2009), em canais laterais (Gregório et al., 2010), em regiões de istmos (Susin et al., 2010), e até o comprimento de trabalho (Gregorio et al., 2012), mesmo em trabalhos realizados *in vivo* como o de Munoz e Cuadra (2012).

As substâncias químicas auxiliares ao preparo endodôntico possuem ação comprovada, mas atuam somente naquelas regiões com as quais fazem contato. A chegada de uma quantidade maior de substância química, sob um fluxo que permita a penetração em áreas de difícil acesso e o carregamento dos debrís, sem dúvida alguma favorece a limpeza.

Diversos autores compararam a remoção de debrís obtida com o sistema EndoVac e outros dispositivos auxiliares na irrigação e aspiração (Nielsen; Baumgartner, 2007; Heilborn et al., 2010; Parente et al., 2010; Abarajithan et al., 2011; Saber; Hashem, 2011; Howard et al., 2011; Ribeiro et al., 2012). Nos terços cervical e médio, geralmente não há diferença entre as técnicas, pois todas elas conseguem êxito. A diferença maior se dá nos milímetros finais do canal, onde o EndoVac e os sistemas ultrassônicos se sobressaem aos demais, mesmo sob a metodologia *in vivo* aplicada por Siu e Baumgartner (2010). Quando não superiores às outras, estas técnicas, no mínimo, são semelhantes estatisticamente, mas nunca inferiores às demais. O que parece lícito afirmar é que, de alguma forma, a substância deve ser agitada, pois quando se trabalha somente com agulha e seringa da forma convencional a limpeza é prejudicada.

Esta melhor capacidade de limpeza também foi testada e está de acordo com o que apresenta Yucel et al. (2011) para a remoção de hidróxido de cálcio das paredes dentinárias. EndoVac e ultra-som são semelhantes entre si mas superiores a irrigação convencional neste quesito.

Apesar de não ser objetivo deste trabalho discorrer sobre substâncias químicas, suas propriedades, vantagens e desvantagens, alguns fatores que influenciam diretamente na desinfecção e na capacidade de limpeza foram levados em consideração. Foram tomados cuidados para que volume, tempo de ação e tensão superficial das substâncias de escolha estivessem dentro daquilo que os estudos revisados indicam (Pecora et al., 1991; Tasman et al., 2000; Teixeira et al., 2005; Giardino et al., 2006; Huang et al., 2008). O volume total utilizado com o sistema EndoVac é maior do que o utilizado com irrigação convencional dentro do mesmo período de tempo (Nielsen; Baumgartner, 2007; Kurtzman, 2009; Brunson et

al., 2010) e poderia ter favorecido os resultados deste sistema caso este cuidado não fosse tomado.

Obviamente, os resultados encontrados pelos estudos científicos aqui revisados e discutidos são importantíssimos para a decisão na conduta clínica em endodontia. Entretanto, as variáveis e possibilidades envolvidas são inúmeras, e, até o momento, impossíveis de serem fielmente reproduzidas. Jamais devemos esquecer que existe uma particularidade em cada caso, principalmente relacionada ao paciente e suas respostas orgânicas. Desta forma, podemos até discutir e comprovar a superioridade de um sistema ou técnica sobre a outra em um determinado quesito avaliado, mas daí a inferir que esta superioridade se traduz clinicamente em um aumento nos índices de sucesso, há um longo caminho a ser percorrido. Esta mesma visão vai de acordo com aquilo que Gu et al. (2009) concluíram após revisar todos os sistemas de irrigação e aspiração disponíveis.

O discernimento e o bom senso devem ser habilidades a serem desenvolvidas pelo endodontista, que deve conhecer as possibilidades de tratamento e saber aplicá-las a casos onde estejam mais indicadas. A superioridade de uma técnica ou outra pode também estar ligada às habilidades do profissional e a seus hábitos de trabalho.

No que diz respeito às técnicas de irrigação e aspiração mais utilizadas, a pesquisa realizada por Dutner et al. (2012) mostrou que metade dos especialistas na área de endodontia dos Estados Unidos vêm utilizando algum tipo de dispositivo para potencializar esta etapa, entre eles, o EndoVac. Esta realidade provavelmente não é a mesma em outras regiões do planeta. A falta de informação e capacitação, dificuldade de acesso a novas tecnologias, ou fatores financeiros influenciam na escolha do protocolo e não devem ser desconsiderados.

Como toda mudança, a troca da técnica utilizada para irrigação e aspiração também gera desordem na rotina habitual. Trabalhar com qualquer outro sistema ou com o sistema EndoVac em particular, inicialmente é um desafio para qualquer profissional. Existe uma curva de aprendizagem, que pode variar individualmente, mas que necessita de paciência e perseverança para mudar hábitos repetidos ao longo de anos. É fundamental, por exemplo, trabalhar com uma pressão de sucção adequada na bomba a vácuo para favorecer o fluxo, adaptar-se com a presença de mangueiras e presilhas extras, treinar auxiliares e funcionários, e fazer

reconstruções coronárias prévias para armazenamento de substância química na câmara pulpar e prevenção de acidentes com o hipoclorito.

Quando outros autores buscaram avaliar a capacidade de eliminação de microrganismos com o uso do sistema EndoVac, foram encontrados resultados semelhantes e comparáveis aos desta pesquisa. Miller e Baumgartner (2010), além de Brito et al. (2009) e Pawar et al. (2012) observaram que não havia diferença estatisticamente significativa na descontaminação obtida após o preparo com irrigação convencional ou EndoVac. Brito et al. (2009) ainda enfatizam que ambas as técnicas foram capazes de reduzir acima de 99% dos microrganismos encontrados anteriormente ao preparo. Por outro lado, Hockett et al. (2008) e Cohenca et al. (2010) encontraram resultados favoráveis ao uso de pressão apical negativa sobre irrigação convencional ou mesmo sobre o uso de medicação intracanal com pasta triantibiótica. O único trabalho onde o EndoVac foi inferior a outros métodos no quesito redução de microrganismos foi o de Townsend e Maki (2009), sendo superado principalmente pelo ultra-som.

Entretanto, a comparação de resultados com esta pesquisa torna-se difícil em razão das metodologias empregadas, pois nenhum dos trabalhos mencionados utilizou técnicas de biologia molecular na identificação dos patógenos. Além disso, somente Pawar et al. (2012) e Cohenca et al. (2010) coletaram amostras *in vivo*, tendo todos os demais trabalhado *in vitro* com inoculação de *E. faecalis*.

A ausência de diferença estatística entre os grupos aqui analisados pode ser o que se traduz na realidade, mas também não podemos deixar de associar esta informação ao tamanho pequeno de amostra desta pesquisa. As dificuldades ao se realizar um trabalho *in vivo* são comuns e largamente discutidas na literatura endodôntica. Os fatores de inclusão e exclusão, principalmente em microbiologia, também limitam a seleção de pacientes.

A quantificação de microrganismos em infecções primárias através do PCR em tempo real vem sendo utilizada por outros autores. Os níveis totais antes do preparo, obtidos nesta pesquisa, estão de acordo com aqueles que podemos observar nos trabalhos já publicados, que variam entre 10^6 e 10^7 em média, mas podendo apresentar limites mínimos e máximos de 10^3 até 10^8 . A média aqui encontrada foi ligeiramente maior (10^8) (Vianna et al., 2006; Sakamoto et al., 2007; Blome et al., 2008).

Com relação aos níveis encontrados após o preparo, a média desta pesquisa também ficou dentro do que os mesmos autores supracitados obtiveram como resultados, algo em torno de 10^5 , valendo a mesma consideração do volume de DNA utilizado na reação para justificar o número um pouco maior do que o 10^4 que os demais autores apresentaram. Apenas 1 dos 20 casos avaliados não teve DNA detectável após o preparo, e esta quantidade também foi baixa na literatura consultada, mostrando que, apesar de uma considerável redução, as técnicas utilizadas até o momento não são 100% efetivas na eliminação de microrganismos.

O percentual de redução em torno de 97,52% está em concordância com outros autores que utilizaram esta mesma metodologia. Os números, em geral, variam pouco, estando sempre acima de pelo menos 95% e, na maioria das vezes, acima de 99% (Tang et al., 2004; Vianna et al., 2006; Sakamoto et al., 2007; Blome et al., 2008; Vianna et al., 2008; Jiang et al., 2009; Roças; Siqueira 2010; Alves et al., 2012).

É pertinente observar, que as coletas clínicas, na grande maioria das vezes, evidenciam a microbiota presente na luz do canal principal, pois é difícil coletar aqueles microrganismos que colonizam as reentrâncias da microanatomia. Uma possibilidade para novos trabalhos, seria manter o canal radicular preenchido por solução fisiológica estéril por alguns dias, permitindo que os microrganismos recolonizassem a luz do canal e pudessem também ser identificados, o que por razões éticas só poderia ser feito *in vitro*.

Por serem recentes, as técnicas moleculares ainda não foram utilizadas em um número expressivo de trabalhos que comparem sistemas mais recentes de irrigação ou de preparo. No caso do EndoVac, este foi o primeiro estudo que utilizou este tipo de metodologia para observar redução de microrganismos. Novas pesquisas, com amostras maiores, e observando variáveis como anatomia e utilização ou não de medicação intracanal devem ser conduzidas para elucidação das questões referentes a este tema. Também é válido comparar os resultados a outros sistemas de irrigação, principalmente o ultra-som, além de relacionar a quantidade e qualidade das bactérias a sinais e sintomas clínicos.

7 CONCLUSÕES

Diante da metodologia utilizada e da análise dos resultados obtidos, é lícito concluir que o sistema EndoVac de irrigação e aspiração, utilizado durante o preparo químico mecânico, apresentou eficácia antibacteriana semelhante ao preparo realizado com o sistema de irrigação e aspiração convencional.

REFERÊNCIAS¹

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;112:407-11.

Abou-Rass M, Bogen G. Microorganisms in closed periapical lesions. *Int Endod J.* 1998;31:39-47.

Alves FR, Rôças IN, Almeida BM, Neves MA, Zoffoli J, Siqueira JF Jr. Quantitative molecular and culture analyses of bacterial elimination in oval-shaped root canals by a single-file instrumentation technique. *Int Endod J.* 2012 Mar 23; [Epub ahead of print] [citado 28 abr. 2012] Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.13652591.2012.02045.x/abstract;jsessionid=1B30ACB206B991A31CB6EB3F5E1367E7.d02t03>.

Assed S, Leonardo MR, Silva LAB, Lopatin D. Anaerobic microorganisms in root canals of human teeth with chronic apical periodontitis detected by indirect immunofluorescence. *Endod Dent Traumatol.* 1996;12:66-8.

Aun CE. Análise "in vitro", através da microscopia eletrônica de varredura, da quantidade de canalículos dentinários livres da camada residual de magma do terço apical do canal radicular, após preparo químico-mecânico, variando-se o instrumento e seu número de uso [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia;1990.

Baratto Filho F, Carvalho Junior JR, Fariniuk LF, Souza Neto MD, Cruz Filho AM, Pecora JD. Morphometric analysis of the effectiveness of different concentrations of sodium hypochlorite associated with rotary instrumentation for root canal cleaning. *Braz Dent J.* 2004;15(1):36-40.

Bergenholtz G. Microorganisms from necrotic pulp of traumatized teeth 1. *Odontologisk Revy.* 1974;25:347-58.

Blome B, Braun A, Sobarzo V, Jepsen S. Molecular identification and quantification of bacteria from endodontic infections using realtime polymerase chain reaction. *Oral Microbiol Immunol.* 2008;23:384–90.

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

Boutsioukis C, Lambrianidis T, Kastrinakis E, Bekiaroglou P. Measurement of pressure and flow rates during irrigation of a root canal ex vivo with three endodontic needles. *Int Endod J*. 2007;40:504–13.

Brito RRP, Souza, LC, de Oliveira JCM, Alves FRF, De-Deus G, Lopes HP, Siqueira Jr JF. Comparison of the Effectiveness of Three Irrigation Techniques in Reducing Intracanal *Enterococcus faecalis* Populations: An *In Vitro* Study. *J Endod*. 2009 Oct;35(10):1422-7.

Brown LR, Rudolph CE. Isolation and identification of microorganisms from unexposed canals of pulp-involved teeth. *Oral Surg*. 1957;10(10):1094-9.

Brunson M, Heilborn C, Johnson DJ, Cohenca N. Effect of apical preparation size and preparation taper on irrigant volume delivered by using negative pressure irrigation system. *J Endod*. 2010;36:721-4.

Byström A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the effect of 0.5 percent sodium hypochlorite in endodontic therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1983;55:307-12.

Çalışkan MK, Turkun M, Alper S. Allergy to sodium hypochlorite during root canal therapy: a case report. *Int Endod J*. 1994;27:163-7.

Ciucchi B, Khettabi M, Holz J. The effectiveness of different endodontic irrigation procedures on the removal of the smear layer: a scanning electron microscopic study. *Int Endod J*. 1989 Jan;22(1):21-8.

Cohenca N, Heilborn C, Johnson JD, Flores DSH, Ito IY, da Silva LAB. 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;109(1):e42-e46.

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

Dutner J, Mines P, Anderson A. Irrigation Trends among American Association of Endodontists Members: A Web-based Survey. *J Endod*. 2012 Jan;38(1):37-40.
Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *Int Endod J*. 2002; 35:221-8.

Fabricius L, Dahlen G, Holm SE, Moller AJR. Influence of combinations of oral bacteria on periapical tissues of monkeys. *Scand J Dent Res*. 1982;90:200-6.

Ferrari PHP, Bombana AC. *A infecção endodôntica e sua resolução*. São Paulo: Santos; 2010. 358 p.

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;39:93–9.

Gavini G, Aun CE, Pesce HF. Análise das condições de limpeza do terço apical do canal radicular, após o preparo químico-mecânico, variando-se a solução irrigadora e seu volume. *Rev Odontol USP*. 1994;8(3):155-62.

Gernhardt CR, Eppendorf K, Kozlowski A, Brandt M. Toxicity of concentrated sodium hypochloride used as an endodontic irrigant. *Int Endod J*. 2004;37:272-280.

Giardino L, Ambu E, Becce C, Rimondini L, Morra M. Surface Tension Comparison of Four Common Root Canal Irrigants and Two New Irrigants Containing Antibiotic. *J Endod*. 2006 Nov;32(11):1091-3.

Goldman L, Goldman M, Kronman J, Lin PS. The efficacy of several irrigating solutions for endodontics: a scanning electron microscopic study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1981 Aug;52(2):197-204.

Goldman M, Kronman JH, Goldman LB, Clausen H, Grady J. New method of irrigation during endodontic treatment. *J Endod*. 1976;2:257–60.

Gomes BP, Pinheiro ET, Gadê-Neto CR, Sousa EL, Ferraz CC, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiol Immunol*. 2004 Apr;19(2):71-6.

Gomes BPFA, Drucker DB, Lilley JD. Association of specific bacteria with some endodontic signs and symptoms. *Int Endod J*. 1994;27:291-8.

Gondim E Jr, Setzer F, Zingg P, Karabucak B. A Maxillary Central Incisor with Three Root Canals: A Case Report. *J Endod*. 2009 Oct;35(10):1445-7.

Gondim E Jr, Setzer FC, dos Carmo CB, Kim S. Postoperative Pain after the Application of Two Different Irrigation Devices in a Prospective Randomized Clinical Trial. *J Endod.* 2010 Aug;36(8):1295-301.

Gregório C, Estevez R, Cisneros R, Paranj A, Cohenca N. Efficacy of Different Irrigation and Activation Systems on the Penetration of Sodium Hypochlorite into Simulated Lateral Canals and up to Working Length: An *In Vitro* Study. *J Endod.* 2010 Jul;36(7):1216-21.

Gregorio C, Paranjpe A, Garcia A, Navarrete N, Estevez R, Esplugues EO, Cohenca N. Efficacy of irrigation systems on penetration of sodium hypochlorite to working length and to simulated uninstrumented areas in oval shaped root canals. *Int Endod J.* 2012 May;45(5):475-81.

Gu LS, Kim JR, Ling J, Choi KK, Pashley DH, Tay FR. Review of contemporary irrigant agitation techniques and devices. *J Endod.* 2009;35:791–804.

Haapasalo M. *Bacteroides* spp. in dental root infections. *Endod Dent Traumatol.* 1989;5:1-10.

Heilborn C, Reynolds K, Johnson JD, Cohenca N. Cleaning efficacy of an apical negative pressure irrigation system at different exposure times. *Quintessence Int.* 2010;41:759-67.

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.

Holland R, Nery MJ, Rebello FJGD, Souza V, Bernabé PFE, Mello W, Otoboni Filho JA. Presença de detritos na região apical de dentes de cães após o preparo biomecânico com ou sem o emprego de substância auxiliar cremosa. *Rev Odont UNESP.* 1990;19:105-12.

Howard RK, Kirkpatrick TC, Rutledge RE, Yaccino JM. Comparison of Debris Removal with Three Different Irrigation Techniques. *J Endod.* 2011 Sep;37(9):1301-5.

Hsieh YD, Gau CH, Kung Wu SF, Shen EC, Hsu PW, Fu E. Dynamic recording of irrigating fluid distribution in root canals using thermal image analysis. *Int Endod J.* 2007;40:11–7.

Huang TY, Gulabivala K, Ng YL. A bio-molecular film ex-vivo model to evaluate the influence of canal dimensions and irrigation variables on the efficacy of irrigation. *Int Endod J.* 2008;41:60–71.

Hülsmann M, Hahn W. Complications during root canal irrigation – literature review and case reports. *Int Endod J.* 2000;33:186–193.

Jacinto RC, Gomes BP, Ferraz CC, Zaia AA, Filho FJ. Microbiological analysis of infected root canals from symptomatic teeth with periapical periodontitis and the antimicrobial susceptibility of some isolated anaerobic bacteria. *Oral Microbiol Immun.* 2003;18:285-92.

Jiang YT, Xia WW, Liang JP, Ma SF, Yan PF. Quantitative evaluation of residual endodontic microorganisms after mechanical root canal preparation different chemical preparations by real-time PCR. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue.* 2009 Feb;18(1):10-4.

Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposure of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg.* 1965;20:340-9.

Khademi A, Feizianfard M. The Effect of EDTA and Citric Acid on Smear Layer Removal of Mesial Canals of First Mandibular Molars, A Scanning Electron Microscopic Study. *J Res Medi Sci.* 2004;9(2):27-35.

Kobayashi T, Hayashi A, Yoshikawa R, Okuda K, Hara K. The microbial flora from root canals and periodontal pocket of non-vital teeth associated with advanced periodontitis. *Int Endod J.* 1990;23:100-6.

Kurtzman GM. Improving endodontic success through use of the EndoVac irrigation system. *Endod Pract.* 2009 Feb;17-20.

Lana MA., Ribeiro-Sobrinho AP, Stehing R, Garcia GD, Silva BK, Hamdan JS, Nicoli JR, Carvalho MA, Faarias L. Microorganisms isolated from root canals presenting necrotic pulp and their drug susceptibility *in vitro*. *Oral Microbiol Immunol.* 2001; 16:100-5.

Lopes HP, Estrela C, Elias CN, Toniasso S. Smear layer removal: influence of the mechanical stirring of the chelating agent (EDTA). *Brasilian Endodontic Journal.* 1996;1(1):52-5.

Lopes HP, Siqueira JF Jr. Endodontia: biologia e técnica. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2010. 951 p.

Luebke RG. Pulp cavity debridement and disinfection. Dent Clin North Am. 1967 Nov;603-13.

MacDonald JB, Hare GC, Wood AWS. The bacteriological status of the pulp chambers in intact teeth found to be non-vital following trauma. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1957;10:318-22.

Martinho FC. Análise microbiológica, quantificação de endotoxinas de dentes com infecções endodônticas primárias e suscetibilidade antimicrobiana [dissertação]. Piracicaba: Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia; 2007.

Masillamoni CRM, Kettering JD, Torabinejad M. The Biocompatibility of some root canal medicaments and irrigants. Int Endod J. 1981;14:115-20.

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.

Miller WD. An introduction to the study of the bacteria pathology of the dental pulp. Dent Cosmos. 1894;36:505-28.

Mitchell RP, Baumgartner JC, Sedgley CM. Apical Extrusion of Sodium Hypochlorite Using Different Root Canal Irrigation Systems. J Endod. 2011 Dec;37(12):1677-81.

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

Möller AJL, Fabricius L, Dahlén G, Öhman AE, Heyden G. Influence on Periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in mokeys. Scand J Dent Res. 1981;89:475-84.

Moura AAM. Análise "in vitro" da permeabilidade dentinária radicular quando do emprego de instrumentos endodônticos, tendo como fonte de variação o instrumento e o número de uso [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 1985.

Munoz HR, Cuadra KC. *In Vivo* Efficacy of Three Different Endodontic Irrigation Systems for Irrigant Delivery to Working Length of Mesial Canals of Mandibular Molars. *J Endod*. 2012 Apr;38(4):445-8.

Nair PNR. Light and electron microscopic studies on root canal flora and periapical lesions. *J Endod*. 1987;13:29-39.

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

Paiva JG, Antoniazzi JH. *Endodontia: bases para a prática clínica*. 2ª ed. São Paulo: Artes Médicas; 1991.

Parente JM, Loushine RJ, Susin L, Gu L, Looney SW, Weller RN, et al. 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;43:1001-12.

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.

Pecora JD, Guimaraes LF, Savioli RN. Surface tension of several drugs used in Endodontics. *Braz Dent J*. 1991;2:123-7.

Prokopowitsch I. Análise "in vitro" da permeabilidade dentinária radicular do terço apical, tendo como fonte de variação a substância química auxiliar da instrumentação [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 1988.

Ribeiro EM, Silva-Souza YTC, Souza-Gabriel AE, Sousa-Neto MD, Lorencetti KT, Silva SRC. Debris and Smear Removal in Flattened Root Canals After Use of Different Irrigant Agitation Protocols. *Microsc Res Tech*. 2012 Jun;75(6):781-90.

Rôças IN, Siqueira JF Jr. Identification of Bacteria Enduring Endodontic Treatment Procedures by a Combined Reverse Transcriptase–Polymerase Chain Reaction and Reverse-Capture Checkerboard Approach. *J Endod*. 2010 Jan;36(1):45-52.

Saber SED, Hashem AAR. Efficacy of Different Final Irrigation Activation Techniques on Smear Layer Removal. *J Endod*. 2011 Sep;37(9):1272-5.

Sakamoto M, Siqueira JF Jr, Rocas IN, Benno Y. Bacterial reduction and persistence after endodontic treatment procedures. *Oral Microbiol Immunol*. 2007;22:19–23.

Sassone L, Fidel R, Figueiredo L, Fidel S, Favari M, Feres M. Evaluation of the microbiota of primary endodontic infections using checkerboard DNA-DNA hybridization. *Oral Microbiol Immunol*. 2007 Dec;22(6):390-7.

Schilder H. Cleaning and shaping the root canal. *Dental Clin North Am*. 1974;18(2):269-96.

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

Schoeffel GJ. The EndoVac method of endodontic irrigation, Part 3: System Components and Their Interaction. *Dent Today*. 2008b Aug;27(8):106,108-11.

Schoeffel GJ. The EndoVac method of endodontic irrigation: Part 4, Clinical Use. *Dent Today*. 2009 Jun;28(6):64,66-7.

Schoeffel GJ. The EndoVac method of endodontic irrigation: Safety First. *Dent Today*. 2007 Oct;26(10):92, 94, 96 passim.

Sedgley C, Nagel A, Dahlén G, Reit C, Molander A. Real-time quantitative polymerase chain reaction and culture analyses of *Enterococcus faecalis* in root canals. *J Endod*. 2006;32:173-7.

Shelburne CE, Prabhu A, Gleason RM, Mullally BH, Coulter WA. Quantitation of *Bacteroides forsythus* in subgingival plaque comparison of immunoassay and quantitative polymerase chain reaction. *J Microbiol Methods*. 2000;39:97-107.

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;109:479–84.

Silva LAB, Nelson-Filho P, da Silva RAB, Flores DSH, 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;109:779-87.

Simi Junior J, Pesce HF, Medeiros JMF. Eficácia de substâncias químicas auxiliares na instrumentação de canais radiculares. *Rev Odontol Univ São Paulo*. 1999;13(2):153-7.

Siqueira JF Jr., Rôças IN. Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 2 - Redefining the endodontic microbiota. *J Endod*. 2005 Jul;31(7):488-98.

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 Nov;36(11):1782-5.

Soares IJ, Goldberg F. Endodontia: técnica e fundamentos. 2ª ed. Porto Alegre: Artmed; 2001.

Spångberg LSM. Endodontic Medicaments. In: Smith DC, Williams DF. *Biocompatibility of Dental Materials*. 1st ed. Boca Raton, USA: CRC Press; 1982. p. 223-257.

Spencer HR, Ike V, Brennan PA. Review: the use of sodium hypochlorite in endodontics — potential complications and their management. *British Dental Journal*. 2007;202(9):555–9.

Stashenko P, Yu SM, Wang CY. Kinetics of immune cell and bone resorptive responses to endodontic infections. *J Endod*. 1992;18:422-6.

Sundqvist G. Bacteriologic studies of necrotic dental pulps [dissertation]. Umea, Sweden: University of Umea, University Odontological; 1976.

Sundqvist G. Taxonomy, ecology and pathogenicity of the root canal flora. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1994;78:522-30.

Sundqvist G, Johansson E, Sjögren U. Prevalence of black-pigmented *bacteroides* species in root canal infections. *J Endod*. 1989;15:13-9.

Susin L, Liu Y, Yoon JC, Parente JM, Loushine RJ, Ricucci D, Bryan T, Weller RN, Pashley DH, Tay FR. Canal and isthmus debridement efficacies of two irrigant agitation techniques in a closed system. *Int Endod J*. 2010;43:1077–90.

Tang G, Samaranayake LP, Yip H-K. Molecular evaluation of residual endodontic microorganisms after instrumentation, irrigation and medication with either calcium hydroxide or Septomixine. *Oral Dis*. 2004;10:389–97.

Tasman F, Çehreli ZC, Ogan C, Etikan I. Surface tension of root canal irrigants. *J Endod*. 2000;26:586–87.

Teixeira CS, Felipe MCS, Felipe WT. The effect of application time of EDTA and NaOCl on intracanal smear layer removal: an SEM analysis. *Int Endod J*. 2005;38:285–90.

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.

Trope M. Treatment of immature teeth with non-vital pulps and apical periodontitis. *Endod Topics*. 2006;14:51-9.

van Leeuwenhoek A. A specimen of some Observations made by a Microscope, contrived by M. Leeuwenhoeck in Holland, lately communicated by Dr. Regnerus de Graaf. *Roy. Soc. (London) Phil. Trans*. 1673;8(94): 6037.

Vera J, Arias A, Romero M. Dynamic Movement of Intracanal Gas Bubbles during Cleaning and Shaping Procedures: The Effect of Maintaining Apical Patency on Their Presence in the Middle and Cervical Thirds of Human Root Canals-An *In Vivo* Study. *J Endod*. 2012 Feb;38(2):200-3.

Vianna ME, Horz HP, Conrads G, Feres M, Gomes BP. Comparative analysis of endodontic pathogens using checkerboard hybridization in relation to culture. *Oral Microbiol Immunol*. 2008 Aug;23(4):282-90.

Vianna ME, Horz HP, Gomes BPFA, Conrads G. *In vitro* evaluation of Microbial reduction after chemo-mechanical preparation of human root canals containing necrotic pulp tissue. *Int Endod J*. 2006;39:484-92.

Wang CY, Stashenko P. Kinetics of bone-resorbing activity in developing periapical lesions. *J Dent Res*. 1991;70:1362-6.

Williams JM, Trope M, Caplan DJ, Shugars DC. Detection and quantification of *E. faecalis* by real-time PCR (qPCR), reverse transcription-PCR (RT-PCR), and cultivation during endodontic treatment. *J Endod.* 2006; 32:715-21.

Winkler KC, van Amerongen J. Bacteriology results from 4000 root canal cultures. *Oral Surg.* 1959;12(7):857-75.

Wu MK, Wesselink PR. A primary observation on the preparation and obturation of oval canals. *Int Endod J.* 2001 Mar;34(2):137-41.

Yoshida M, Fukushima H, Yamamoto K, Ogawa K, Sagawa H. Correlation between clinical symptoms and microorganisms isolated from root canal of teeth with periapical pathosis. *J Endod.*1987;13:24-8.

Yucel AÇ, Gurel M, Guler E, Karabucak B. Comparison of final irrigation techniques in removal of calcium hydroxide. *Aust Endod J.* 2011 Dec 13 [Epub ahead of print] [cited 25 abr 2012]. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1747-4477.2011.00326.x/abstract>.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da FOU SP



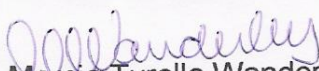
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

PARECER DE APROVAÇÃO
Protocolo 202/10
CAAE 0019.0.017.000-11

Com base em parecer de relator, o Comitê de Ética em Pesquisa **APROVOU** o protocolo de pesquisa **“Análise in vivo da redução de endotoxinas em canais radiculares após preparo químico cirúrgico com diferentes protocolos de irrigação”**, de responsabilidade do(a) Pesquisador(a) Leandro Manenti Bitencourt sob orientação do Prof. Dr. Celso Luiz Caldeira.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados a este Comitê relatórios anuais referentes ao andamento da pesquisa e ao término cópia do trabalho em “cd”. Qualquer emenda do projeto original deve ser apresentada a este CEP para apreciação, de forma clara e sucinta, identificando a parte do a ser modificada e suas justificativas.

São Paulo, 19 de abril de 2011.


Prof. Dra. Marcia Turolla Wanderley
Coordenadora do CEP-FOUSP