



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
MESTRADO EM ODONTOLOGIA – ÁREA DE CONCENTRAÇÃO ENDODONTIA

**QUANTIFICAÇÃO MICROBIANA EM LÚMEN E TÚBULOS DENTINÁRIOS DE 3
PROTOCOLOS DE CONTAMINAÇÃO *IN VITRO*.**

FLORIANÓPOLIS

2023

HELOISA CARDOSO MARTINS

**QUANTIFICAÇÃO MICROBIANA EM LÚMEN E TÚBULOS DENTINÁRIOS DE 3
PROTOCOLOS DE CONTAMINAÇÃO *IN VITRO*.**

Projeto de Pesquisa submetido ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Odontologia – Área de concentração em Endodontia.
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Thais Mageste Duque
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Juliana da Silva Ribeiro de Andrade

FLORIANÓPOLIS

2023

Ficha de identificação da obra enviada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC

Martins, Heloisa Cardoso

Quantificação microbiana em lúmen e túbulos dentinários de 3 protocolos de contaminação *in vitro* [dissertação] / Heloisa Cardoso Martins ; orientadora, Thais Mageste Duque ; coorientador, Juliana da Silva Ribeiro de Andrade. - Florianópolis, SC, 2023.

81 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

...

HELOISA CARDOSO MARTINS

**QUANTIFICAÇÃO MICROBIANA EM LÚMEN E TÚBULOS DENTINÁRIOS DE 3
PROTOCOLOS DE CONTAMINAÇÃO *IN VITRO*.**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre em Odontologia com ênfase em Endodontia da Universidade Federal de Santa Catarina. O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado no dia 03 de agosto de 2023 pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

PROF^a. DR^a. THAIS MAGESTE DUQUE
Presidente, UFSC

PROF. DR. FRANCISCO MONTAGNER
Membro Titular, UFRGS

PROF. DR. RICARDO RUIZ MAZZON
Membro Titular, UFSC

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestre em Odontologia com ênfase em Endodontia.

COORDENAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO

ORIENTADOR

Florianópolis
2023

**AOS
MEUS GUIAS ESPIRITUAIS EXU TRANCA RUAS E EXU DA MEIA NOITE
PELA LUZ, PROTEÇÃO E BONDADE EM MEU CAMINHO.
LAROYE, EXU!**

AGRADECIMENTOS

À minha querida amiga e eterna Professora **THAIS MAGESTE DUQUE** que continuamente caminha ao meu lado, de mãos dadas comigo e com a microbiologia. Obrigada por ter acreditado e confiado em mim mais que eu mesma, por ter me incentivado, por ter aberto TODAS as portas que podias abrir dentro da Universidade para mim. Agradeço pela orientação muito segura e precisa, resultado de seu brilhantismo e luz própria. Seu exemplo de dedicação e amor pelo ensino, pela pesquisa e pela extensão muito me motiva e tem se tornado um combustível para seguir seus passos. Sinto-me muito honrada e orgulhosa em tê-la novamente como minha orientadora no doutorado. É um sonho sendo realizado.

À Professora **JULIANA DA SILVA RIBEIRO DE ANDRADE**, pela amizade, pela acolhida, pelos bons momentos durante o mestrado, pelos ensinamentos FUNDAMENTAIS e pelas oportunidades que tens me proporcionado ao longo do caminho da docência. Muito, mas muito obrigada. Professora Ju, sem sua ajuda, essa pesquisa não teria saído! Obrigada por tudo!

Aos Professores **RICARDO RUIZ MAZZON** e **FABIENNE ANTUNES FERREIRA** por toda a atenção, pelo carinho enorme que me receberam, pela disposição em me ajudar sempre que precisei e por terem aberto as portas do Laboratório, lugar em que adotei como minha segunda casa (e realmente me senti em casa!) por seis meses ininterruptos, de domingo a domingo, para que eu pudesse desenvolver esta pesquisa.

Às amigas **FLÁVIA CARDOSO AMARAL** e **MAÍSA HELENA HELUANY**, do corpo técnico-científico do LAMEB/UFSC, meus agradecimentos pela amizade e por SEMPRE me ajudarem quando preciso. Sem vocês, esta pesquisa também não teria saído!

Aos meus pais e à minha irmã, pelo apoio incondicional de sempre, carinho e união.

Ao meu anjo **MANOEL BORGES**, meu amor, meu companheiro de outras vidas, obrigada pelo incentivo total, pelo carinho e otimismo. Te amo!

Aos meus irmãos endodontistas que a UFSC me deu, **JULIA ROBERTA REGIS** e **JARDEL DORIGON DOS SANTOS**, que sorte a minha ter vocês como meus amigos! Meu mestrado jamais seria o mesmo sem a amizade e a parceria tão preciosa de vocês dois. Amo vocês!

E por fim, a toda a proteção, abertura de caminhos, ajuda e incentivo que tenho recebido de meus Guias de Luz. Axé!

O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada.

Caminhando e semeando, no fim, terás o que colher.

Cora Coralina

RESUMO

Modelos de estudo *in vitro* que simulam uma infecção do sistema de canais radiculares são utilizados rotineiramente em estudos laboratoriais para avaliar protocolos de desinfecção e substâncias antimicrobianas na Endodontia. O objetivo desse estudo foi comparar 3 protocolos de contaminação *in vitro* estabelecidos na literatura, através da quantificação microbiana por contagem de UFC de *E. faecalis*, em lúmen e túbulos dentinários. Foram selecionados 48 pré-molares inferiores humanos, com canal central único. Após padronização do tamanho da raiz e diâmetro do canal radicular, os dentes foram divididos em 3 grupos de acordo com o tempo de contaminação de 1, 5 e 21 dias. Após esse período, foram realizadas coletas microbiológicas do lúmen do canal e de profundidade nos túbulos dentinários. A coleta do lúmen foi realizada com o auxílio de cones de papel absorvente que permaneceram no interior do canal por 1 minuto. Depois, as amostras foram clivadas em 3 terços. Para cada terço, foram utilizadas brocas tronco cônicas diamantadas, em ordem crescente de tamanho e os debris coletados. Os cones de papel e os debris foram depositados em microtubos contendo BHI caldo. Os mesmos foram diluídos, plaqueados em BHI ágar e incubados a 37°C por 24 horas para posterior contagem das UFC's. Os dados foram submetidos à análise estatística. A contaminação de 21 dias permitiu maior quantidade de células bacterianas no lúmen do canal radicular e nos túbulos dentinários, nos 3 terços estudados e em todas as profundidades avaliadas, quando comparada à contaminação de 1 e de 5 dias. A contagem de UFC do terço apical foi menor que nos terços cervical e médio no grupo de 21 dias, com valores insignificantes para a contaminação de 1 dia e 5 dias. Concluiu-se que a presença de biofilme imaturo impediu a penetração bacteriana no interior dos túbulos dentinários, sendo o protocolo de contaminação de 21 dias, o que apresentou maior profundidade de penetração alcançada pelos microrganismos.

Palavras-Chave: endodontia; microbiologia; bactéria.

ABSTRACT

In vitro study models that simulate an infection of the root canal system are routinely used in laboratory studies to evaluate disinfection protocols and antimicrobial substances in endodontics. The objective of this study was to compare three established *in vitro* contamination protocols found in the literature, through microbiological quantification by counting CFU (colony-forming units) of *E. faecalis* in the root canal lumen and dentinal tubules. Forty-eight human mandibular premolars with a single central canal were selected. After standardizing the root size and root canal diameter, the teeth were divided into three groups according to the contamination period of 1, 5, and 21 days. After this period, microbiological samples were collected from the canal lumen and depth in the dentinal tubules. The lumen collection was performed using absorbent paper points that remained inside the canal for 1 minute. Then, the samples were divided into thirds. For each third, diamond-shaped taper drills were used in increasing order of size to collect the debris. The paper points and debris were deposited in microtubes containing BHI broth. They were diluted, plated on BHI agar, and incubated at 37°C for 24 hours for subsequent CFU counting. The data were subjected to statistical analysis. In the lumen collection and the three depths of the three thirds, the 21-day contamination showed higher counts and presented statistical differences compared to the 1-day and 5-day contamination. The CFU count in the apical third was lower than in the cervical and middle thirds in the 21-day group, with insignificant values for the 1-day and 5-day contamination. It was concluded that the presence of immature biofilm prevented bacterial penetration into the dentinal tubules, and the 21-day contamination protocol showed the greatest depth of penetration achieved by microorganisms.

Key-words: *endodontics; microbiology; bacteria.*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	01
1.1 A Infecção Endodôntica-----	01
1.2 Modelos de Contaminação-----	01
1.3 Morfologia dos Túbulos Dentinários-----	02
1.4 Importância de Polpa Vital e Necrosada na Difusão da Contaminação-----	03
1.5 <i>Enterococcus faecalis</i> -----	03
1.6 Vapor Lock-----	05
1.7 Trabalhos que avaliaram contaminação de lúmen e/ou túbulos através de técnicas moleculares e/ou culturas-----	06
1.8 Trabalhos que avaliaram contaminação através de microscopia-----	09
2 JUSTIFICATIVA	22
3 OBJETIVOS & HIPÓTESES	22
4 MATERIAIS & MÉTODOS	23
4.1 Autorização para Realização da Pesquisa e Considerações Éticas-----	23
4.2 Local de Realização da Pesquisa-----	23
4.3 Delineamento do Estudo-----	23
4.4 Seleção da Amostra-----	23
4.5 Preparação e Padronização das Amostras-----	24
4.5.1 Primeira Análise em Microscopia Eletrônica de Varredura-----	27
4.6 Preparação da Suspensão de Bactérias-----	28
4.7 Contaminação das Amostras -----	28
4.7.1 Protocolo de Contaminação de 1 dia-----	29
4.7.2 Protocolo de Contaminação de 5 dias-----	29
4.7.3 Protocolo de Contaminação de 21 dias-----	30
4.8 Segunda Análise em Microscopia Eletrônica de Varredura-----	30
4.9 Coleta Microbiológica do Lúmen do Canal Radicular-----	31
4.10 Coleta Microbiológica do Interior dos Túbulos Dentinários-----	33
4.11 Análise em Microscopia Confocal-----	41
5 RESULTADOS & ANÁLISE ESTATÍSTICA	42
6 DISCUSSÃO	52
7 CONCLUSÃO	57
8 BIBLIOGRAFIA	58
9 ANEXOS	66

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1.1 A Infecção Endodôntica

A presença de micro-organismos residuais viáveis no sistema de canais radiculares após o preparo químico mecânico, a produção de metabólitos e a infiltração coronária são as causas principais do fracasso do tratamento endodôntico (BICEGO-PEREIRA et al., 2020).

Bactérias remanescentes do preparo químico mecânico são protagonistas do aparecimento e persistência de lesões periapicais (MOLANDER et al., 1998; SUNDQVIST et al., 1998; PINHEIRO et al., 2003; GOMES et al., 2008; SIQUEIRA JR & ROÇAS, 2008). A periodontite apical é uma das doenças inflamatórias orais mais prevalentes na população mundial (ERIKSEN, 2008; TIBURCIO-MACHADO et al., 2021) e as bactérias são o principal agente etiológico desta doença (SIQUEIRA JR & ROÇAS, 2009). O objetivo do tratamento endodôntico é prevenir e tratar a periodontite apical, evitando que bactérias infectem ou reinfectem o sistema de canais radiculares e tecidos periapicais, controlando ou erradicando a infecção pré-existente (ORSTAVIK, 2020). O tratamento endodôntico de um sistema de canais radiculares infectado, caracterizado pelo preparo químico mecânico, reduz o número de micro-organismos, entretanto, não os elimina completamente (BYSTROM et al., 1985ab).

1.2 Modelos de Contaminação

Modelos de estudo *in vitro* que simulam uma infecção do sistema de canais radiculares são adotados para padronizar a avaliação da eficácia de inúmeros protocolos de desinfecção por meio de avaliações laboratoriais (ORSTAVIK & HAAPSALO, 1990), entretanto, não há uma padronização destes métodos de contaminação *in vitro*.

Os desafios apresentados em estudos *in vitro* consistem em superar a variação anatômica dos dentes, como o tamanho e formato dos canais radiculares, em avaliar o tipo e quantidade de microrganismos presentes após a contaminação, além da obtenção de amostras padronizadas contaminadas em áreas representativas do sistema de canais radiculares. A limitação apresentada nesses estudos se dá pela avaliação de culturas planctônicas especialmente em trabalhos de desinfecção, através do contato direto entre

a substância a ser testada e o microrganismo em sua forma livre natante. Apesar deste protocolo apresentar bons resultados, sabe-se que não é esta a realidade apresentada nos estudos *in vivo* para controle e desinfecção do sistema de canais radiculares (SHEN et al. 2009; KURUVILLA et al. 1998). Fatores como a composição química (PORTENIER et al., 2001; 2002) e a própria anatomia dificulta a interpretação dos resultados subestimando o impacto das substâncias desinfetantes sobre os microrganismos.

Diversos modelos de estudos apresentaram metodologia de contaminação a partir de um inóculo bacteriano inserido em dentes preparados como blocos de dentina. Blocos de dentina são utilizados há mais de vinte anos como padrão de corpos de prova (amostra) e permitem penetração bacteriana em profundidades de 150 μm (WEIGER et al., 2002), 300 μm (HORIBA et al., 1990) até 500 μm a partir do lúmen do canal radicular (HAAPASALO & ORSTAVICK, 1987). Para Love (1996), os túbulos dentinários localizados no terço cervical são contaminados em maior profundidade quando comparados aos túbulos localizados em terço médio, que apresentaram contaminação em profundidade quando comparados aos túbulos presentes no terço apical.

1.3 Morfologia dos Túbulos Dentinários

A dentina é um tecido mineralizado composto de aproximadamente de 70% de matéria inorgânica, 18% de matéria orgânica e 12% de água (MJOR, 1972). A estrutura dos túbulos dentinários permite a comunicação direta entre o tecido pulpar e a dentina, sendo esta dependente do número e tamanho dos túbulos dentinários (FORSSELL-AHLBERG et al., 1975). Os túbulos dentinários têm como função de hidratação do dente, transdução de sinais físicos em respostas sensoriais e como âncora dos sistemas adesivos (NANCI, 2012). Este sistema de canais espalha-se, a partir da polpa, na direção da junção dentina-esmalte e cimento. A quantidade e o diâmetro dos túbulos dentinários são menores quanto mais próximo junção dentina esmalte e cimento e aumentam quanto mais próximo da polpa (PASHLEY, 1989; MARSHALL et al., 1997). Em trabalhos de contaminação *in vitro*, o terço cervical é invadido por micro-organismos mais intensamente quando comparado aos demais terços. O terço médio é colonizado mais intensamente que o apical (LOVE, 1996). A quantidade de túbulos dentinários presentes no terço cervical é maior que nos terços médio e apical, mesmo com o fator idade sendo

considerado (CARRIGAN et al., 1984). O mesmo ocorre com a quantidade de túbulos dentinários presente no terço médio, maior que no terço apical (CARRIGAN et al., 1984).

O terço cervical é invadido mais intensamente quando comparado aos demais terços. O terço médio é colonizado mais intensamente que o apical (LOVE, 1996). No terço cervical e médio, os túbulos dentinários são mais calibrosos e são em maior número (AKPATA & BLECHMAN, 1982). A quantidade de túbulos dentinários presentes no terço cervical e médio é maior que no terço apical (CARRIGAN et al., 1984).

1.4 Importância de Polpa Vital e Necrosada na Difusão da Contaminação

Microrganismos invadem o interior de túbulos dentinários de dentes com polpa vital e polpa necrosada, entretanto, a invasão tubular parece ser menos severa em dentes com polpa vital, pela função protetiva exercida pelo tecido pulpar (NAGAOKA et al., 1995). Prolongamentos citoplasmáticos dos odontoblastos, proteínas plasmáticas como fibrinogênio, anticorpos e componentes do sistema complemento do fluido dentinário dificultam a penetração de microrganismos para o interior dos túbulos dentinários (NAGAOKA et al., 1995).

A invasão bacteriana em profundidade no interior de túbulos dentinários protege os microrganismos da ação mecânica dos instrumentos, das soluções químicas e auxiliares de irrigação e da medicação intracanal (LOVE et al., 1997). Combinado a isto, a complexa anatomia e morfologia do sistema de canais radiculares, com presença de istmos, canais acessórios e deltas, debris dentinários, formação de biofilme multiespécie maduro em áreas de difícil acesso fazem com que o tratamento endodôntico seja considerado de alta complexidade (DE GREGORIO et al., 2009; GOLOB et al., 2017).

1.5 *Enterococcus faecalis*

O *Enterococcus faecalis* apresenta-se morfológicamente como uma célula de formato esférico, ovoide ou cocobacilar, com arranjos em pares ou pequenas cadeias. Os enterococos possuem dimensão variando de 0.6 a 2.5 μm , podendo ser móveis, mesmo apresentando poucos flagelos. São Gram positivas, anaeróbias facultativas, capazes de fermentar diversos carboidratos com produção de ácido L-láctico. Essa fermentação ocorre sem produção de gás, com pH variando de 4.2 a 4.6. Crescem geralmente entre

10°C e 45°C, sendo que a temperatura ótima de crescimento é 37°C em pH 9.6 a 11.5 (GIARD et al., 1996).

Esse microrganismo tolera condições inóspitas do ambiente, em grandes níveis de stress, inclusive em ausência de nutrição (GIARD et al., 1996) e por estar associado e ser frequentemente isolado em casos de inflamação periapical persistente, é o microrganismo de escolha para a maioria dos trabalhos endodônticos *in vitro* e formação de biofilme mono espécie (SIREN et al., 1997; SUNDQVIST et al., 1998; MOLANDER et al., 1998, HANCOCK et al., 2001). É facilmente cultivável (PINHEIRO et al., 2003), colabora com o fracasso do tratamento endodôntico (ENGSTROM, 1964; CAVALLERI et al., 1989, GOMES et al., 1996a; MOLANDER et al., 1998; SUNDQVIST, 1998; PECIULIENE et al., 2000; STUART et al., 2006; ZHANG et al., 2015), e é capaz de sobreviver como bactéria única, sem a necessidade de estar associada a outro microrganismo (FABRICIUS et al., 1982; LIU et al., 2010; STUART et al., 2006; ZHANG et al., 2015).

Um dos fatores de virulência crítico para formação de biofilme da *Enterococcus faecalis* é uma adesina, chamada de substância de agregação, codificada por uma proteína do plasmídeo da bactéria, localizado na parede celular (PORTENIER et al., 2003). A adesina é responsável pela adesão das bactérias às proteínas da matriz extracelular do biofilme e ao colágeno tipo I, principal componente orgânico da dentina (PORTENIER et al., 2003). O *Enterococcus faecalis*, que expressa esta proteína, consegue aderir-se ao colágeno tipo I duas vezes mais fortemente que qualquer outra bactéria (PORTENIER et al., 2003) e consegue penetrar profundamente no interior de túbulos dentinários (LOVE, 2001). É considerado um dos principais protagonistas de infecções persistentes (LOVE, 2001, LEE et al. 2004; ROÇAS et al. 2004) por acionar a resposta imune do hospedeiro. Dessa forma, quando expressa proteínas de agregação, altera e suprime a função de ativação e fagocitose dos neutrófilos e macrófagos. Assim, ao induzir e perpetuar a inflamação estimulada pelos linfócitos, com intensa liberação de citoninas, estimula a injúria tecidual permanente (RAKITA et al., 1999; STUART et al., 2006; SIDDIQUI et al., 2013, DAS, 2022).

O ácido lipoteicóico presente na parede celular do *E. faecalis* também age como estimulador de mediadores inflamatórios liberados pelos leucócitos, monócitos e macrófagos (KAYAOGU & ORSTAVIK, 2004), inibe a autólise da parede celular, e é associado a resistência contra substâncias bactericidas utilizadas no canal radicular durante o tratamento endodôntico (SIGNORETTO et al., 2000). O *Enterococcus faecalis* pode ser introduzido no sistema de canais radiculares durante alguma etapa do

tratamento endodôntico, como inadequado protocolo de isolamento absoluto, infiltração coronária ou manutenção de dente que permaneceu aberto para drenagem de exsudato originado de abscesso (SIREN et al., 1997).

A maior suscetibilidade dos demais microrganismos ao preparo químico mecânico faz com que pequena quantidade de bactérias entéricas presentes na infecção endodôntica original se multiplique e sobressaia às demais (SIREN et al., 1997). *E faecalis* caracteriza-se como microrganismo de escolha para estudos experimentais de penetração bacteriana em túbulos dentinários, visto que a infecção por ele gerada é expressiva em gravidade e prevalência (PETERS et al., 2000; DAMETTO et al., 2005). Diversas metodologias permitem o contato direto entre o microrganismo e a substância antimicrobiana a ser testada (GOMES et al., 2001; VIANNA et al., 2004), como também permitem o contato a distância entre a substância a ser testada e o microrganismo (GOMES et al., 2003; MENEZES et al., 2004; DAMETTO et al., 2005; BERBER et al., 2006).

Enterococcus faecalis é prevalente em infecções endodônticas secundárias 9 vezes mais que em infecções endodônticas primárias (AFKHAMI et al., 2020). A contaminação no interior dos túbulos dentinários se dá através de sua ligação com colágeno dentinário, alta resistência ao estresse do ambiente, baixa sensibilidade aos agentes antimicrobianos além da capacidade de inativação dos mesmos (SEDGLEY et al., 2005). O tempo de incubação da *Enterococcus faecalis* apresenta relação direta com a estrutura e resistência do biofilme. Após 1 hora de incubação, a contaminação apresenta-se em formato planctônico para só então começar a formar biofilme. Entretanto, após o período de 3 semanas, o biofilme formado é maduro e resistente (GOLOB et al., 2017). Biofilmes monoespécie têm sido há muito utilizada para a infecção artificial do canal radicular devido suas características de resistência a substâncias desinfetantes utilizadas durante o tratamento endodôntico (CHAVEZ DE PAZ et al., 2010; SWIMBERGUE et al., 2019b). Infecção monoespécie de *Enterococcus faecalis* em canais radiculares *in vivo* já foi descrita previamente (SCHIRRMESTER et al., 2009; TENNERT et al., 2014). Entretanto, é sabido que infecções endodônticas são em sua maioria multiespécies (MADSEN et al., 2016; SIQUEIRA JR & ROÇAS, 2022).

1.6 Vapor Lock

O fenômeno vapor lock é atribuído ao aprisionamento de bolhas de ar durante protocolos passivos de irrigação ou obturação de um sistema de canais radiculares fechado (BANKOFF, 1958; DEUTSCH, 1979; DOVGYALLO et al., 1989; FAZIO & IACONO, 2009; MIGUN & AZUNI, 1996; MIGUN & SHNIP, 2002. PEETERS & GUTKNECHT, 2014) ou pela coalescência de bolhas de ar liberadas durante a dissolução de matéria orgânica por soluções desinfetantes (VERA et al., 2012). Embora seja um fenômeno bastante conhecido, nunca foi provado devido à quantidade limitada de dados a respeito da extensão bloqueada dentro do canal radicular (BOUTSIOUKIS et al., 2014). Entretanto, é sabido que grandes bolhas de ar podem ocupar uma parte considerável do canal radicular a partir do terço médio e pequenas bolhas de ar preenchem o interior dos túbulos dentinários (VERA et al., 2012). A densidade, viscosidade, tensão superficial dos meios líquidos e o método de inundação do canal radicular utilizado têm capacidade de favorecer a formação de vapor lock. O tamanho e a posição de bolhas de ar presas no interior do sistema de canais radiculares podem mudar durante vibração e centrifugação (BOUTSIOUKIS et al., 2014).

1.7 Trabalhos que avaliaram contaminação de lúmen e/ou túbulos através de técnicas moleculares e/ou culturas

O estudo de Haapasalo & Orstavick (1987) propôs uma metodologia de contaminação *in vitro* de blocos de dentina de dentes de boi, utilizando biofilme mono espécie de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) cultivado em extrato de levedura enriquecido com glucose. Os espécimes eram padronizados através da remoção de 2/3 da porção coronária e de 5 mm finais do terço apical, somados ao alargamento do canal radicular em 2 mm de diâmetro. A camada de cimento era removida com auxílio de brocas e a amostra era fatiada em cilindros de 4 mm de espessura. A camada de *smear layer* era removida com banhos de EDTA 17% e os espécimes eram autoclavados a 121°C por 15 minutos em água. Na sequência, eram submersos em caldo de extrato de levedura enriquecido com glucose e incubados por 24 horas a 37°C para confirmação da esterilidade. Transcorrido o tempo, a amostra era submetida a banho ultrassônico por 10 minutos para ampliar a penetração do caldo no interior dos túbulos dentinários. Dois espécimes foram colocados dentro de um tubo e contaminados com inóculo. Cerca de 1,5 a 2,0 ml de meio contaminado era trocado diariamente pela mesma proporção em caldo de levedura, até o 21º dia. A contaminação no interior dos túbulos dentinários foi avaliada

por microscopia eletrônica de varredura após uso do corante de Brown & Brenn. Os espécimes foram removidos dos tubos, secos, e recobertos com uma camada de esmalte de unha. Na sequência, foram montados em posição vertical, sob placas de Petri, fixos na posição com cera pegajosa descontaminada. Pasta a base de hidróxido de cálcio (Calapset) e paramonoclorofenol canforado foram inseridos no interior do canal radicular, preenchendo – o completamente. As amostras foram incubadas a 37°C em condições aeróbicas em intervalos que variaram de 5 minutos a 10 dias. Amostras de raspas de dentina foram coletadas através do uso de brocas diamantadas esféricas ISO 0.23, 0.25, 0.27, 0.29, 0.31, 0.33, 0.35, 0.37, 0.40, 0.42, 0.45 e 0.50, acopladas em peça de mão em baixa rotação. As raspas eram dispensadas em frascos contendo BHI caldo, que foram incubados a 37°C em condições aeróbicas e inspecionadas todos os dias por 7 dias. Quando o crescimento ocorria, verificava-se a turbidez do meio. Observou-se que a invasão bacteriana ocorreu a partir da parede pulpar até a periferia, bem como no sentido contrário, mas em menor intensidade. Após o período de 21 dias, uma grande quantidade de túbulos dentinários estava contaminada a profundidades de 300 – 400 µm. Alguns túbulos apresentaram contaminação em profundidades de 400 – 500 µm e até 800 – 1000 µm. Pela superfície externa da amostra, onde os túbulos dentinários são morfologicamente mais estreitos, a penetração bacteriana alcançou 150 - 280 µm de profundidade. A pasta de hidróxido de cálcio não eliminou bactérias alojadas no interior de túbulos dentinários mesmo após 10 dias de ação no interior do canal radicular.

Stauffacher et al. (2017) se propuseram a investigar as diferenças no padrão de contaminação de túbulos dentinários com biofilme mono e multiespécie, através de cultura e microscopia eletrônica de varredura. Cinquenta e um molares superiores humanos, sem cárie coronária profunda, cárie radicular e sem tratamento endodôntico prévio, foram utilizados para a pesquisa. Somente a raiz palatina foi utilizada, que foi previamente instrumentada em até 1 mm aquém do forame apical, com o sistema ProTaper Next (Denstply Maillerfer, Ballaigues, Suíça) até o instrumento #40/0,06. A solução irrigadora utilizada foi hipoclorito de sódio 3%, seguido de irrigação ultrassônica passiva com EDTA 17% por 1 minuto. O forame apical foi selado com resina flow autoadesiva (Vertise Flow, Kerr, Orange, EUA), simulando um sistema de canais radiculares fechado. Os dentes foram dispostos em blocos de silicone e autoclavados por 20 minutos, a 121 °C. Sete

inóculos foram preparados, individualmente, com as seguintes cepas: *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556), *Streptococcus gordonii* (ATCC 10558), *Prevotella intermedia* (ATCC 25611), *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277), *Fusobacterium nucleatum* (ATCC 25586), *Actinomyces oris* (ATCC 43146), *Parvimonas micra* (ATCC 33270). Além destes, uma combinação de cada uma das cinco últimas cepas mencionadas anteriormente foi preparada em associação com cada uma das duas espécies de *Streptococcus*. Dentro de uma câmara de fluxo laminar, cada amostra foi inoculada com 15 ul das 17 suspensões. As amostras foram colocadas dentro de uma câmara de anaerobiose e incubadas a 37°C por 8 semanas. Uma vez por semana, uma alíquota de inóculo era renovado e a pureza das culturas era monitorada. A cada 3 dias, o meio nutritivo era renovado. Após o período de contaminação, as raízes foram seccionadas longitudinalmente e divididas em 3 partes: terço interno mais próximo do canal radicular, terço médio e terço externo, próximo à camada de cimento. Amostras de raspas de dentina foram coletadas da outra metade radicular seccionada, com auxílio de broca esférica laminada n. 8. As raspas dentinárias foram coletadas em microtubos contendo 100 ul de caldo Wilkins-Chalgren enriquecido com NAD. Os tubos foram vortexados por 10 segundos e 900 ul de caldo era adicionado. Uma alíquota de 10 ul foi plaqueada em placas de TSA. Após 24 horas de incubação anaeróbica, 10uL de caldo enriquecido com 5% de ágar sangue foi transferido para as placas de TSA. Após períodos de 3 a 7 dias de incubação anaeróbica, o crescimento nas placas de ágar foi quantificado para cada cepa bacteriana de acordo com escore: ausência de crescimento, baixo crescimento ou crescimento somente após enriquecimento do meio (menor ou igual a 5 UFC), médio crescimento (menor ou igual a 50 UFC) e alto crescimento (acima de 50 UFC). Para as colônias mistas, foi utilizado método molecular de RNAm para a identificação e contagem das colônias. Todas as culturas monoespécies testadas foram detectadas pelo menos em terço interno, exceto *F. nucleatum*. *S. sanguinis*, *A. oris* e *P. micra* foram encontrados em terço externo próximo à camada de cimento, sendo *A. oris*, a única espécie que se apresentou em maior quantidade. Das culturas mistas, *P. intermedia*, *P. gengivalis* e *P. micra* associados a *S. sanguis* não penetraram no interior dos túbulos dentinários. *A. oris* foi encontrado no interior dos túbulos dentinários dos terços interno e médio e a maioria das amostras apresentou grande concentração desta espécie. *P. intermedia*, de adesão orgânica e tropismo por epitélio e *F. nucleatum*, célula com tamanhos entre 5-10 µm, não foram detectados no interior dos túbulos quando associadas ao *S. gordonii*. Entretanto, *A. oris* em conjunto com *S. gordonii* invadiu os túbulos dentinários em toda sua extensão. A

invasão por *Streptococcus* no interior dos túbulos dentinários dependeu da cepa com a qual houve combinação (Gram-positiva ou Gram-negativa), apresentando diferença estatística significativa nos 3 terços. Os autores relacionaram a profundidade de invasão bacteriana dependente do diâmetro tubular, considerando a esclerose e obliteração presentes em amostra de dentes de pacientes com mais idade. Bactérias Gram-positivas quando em monocultura, penetram em maior profundidade que Gram-negativas. Fibrilas que se estendem pela parede celular de *P. intermedia* podem dificultar a penetração para o interior dos túbulos dentinários. *S. gordonii* em associação a *P. gingivalis* apresentou alto poder de penetração devido a síntese pela *S. gordonii* de polipeptídeos de ligação para adesão ao colágeno tipo 1 e *P. gingivalis*. O formato fusiforme e tamanho de *F. nucleatum* dificultou a invasão para o interior dos túbulos dentinários. O alto poder de invasão intratubular ocorreu especialmente quando houve associação de bactérias, resultado que corroborou com estudos *in vivo*.

1.8 Trabalhos que avaliaram contaminação através de microscopia

Akpata & Blechman (1982) avaliaram contaminação das paredes dentinárias pelos microrganismos: *Bacteroides melanogenicus* (ATCC 25847), *Peptococcus asaccharolyticus* (ATCC 14963), *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433) e *Streptococcus sanguis* (ATCC 10556). Catorze dentes humanos entre incisivos e caninos foram selecionados para o estudo. Cavidade de acesso tradicional foi realizada para a remoção de todo o tecido pulpar do conduto radicular. Os canais foram preparados com técnica manual com pelo menos 3 instrumentos, finalizando o preparo em diâmetro final 3 tamanhos maiores que o diâmetro anatômico, com auxílio de solução fisiológica. O forame apical foi selado com bolinha de algodão e os espécimes foram esterilizados em óxido de etileno. Na sequência, o canal radicular foi preenchido com 0,1 ml de cada inóculo previamente preparado e a cavidade foi selada com uma bolinha de algodão estéril. Parte das amostras foram imersas em caldo cozido de carne e parte em extrato de levedura enriquecido com glucose, a depender do metabolismo do microrganismo inoculado. As amostras foram incubadas por períodos de 1, 2 e 3 semanas em anaerobiose e aerobiose, a depender do micro-organismo inoculado. Alíquotas de cada amostra eram plaqueadas em ágar sangue para controle microbiológico. Após o período de incubação, foram preparados cortes histológicos das amostras a partir da fixação em formol neutro 10%, seguido de desmineralização em ácido fórmico, desidratação e

infiltração com parafina líquida. A coroa clínica e os 2/3 apicais foram removidos. O remanescente foi clivado em 3 terços de 7 µm de espessura, obtendo-se 12 terços cervicais, 12 terços médios e 12 terços apicais ao total. Após coloração de Brown & Brenn, as amostras foram analisadas em microscópio óptico com aumento de 640x. Verificou-se que a profundidade de penetração dos micro-organismos no interior dos túbulos dentinários é diretamente proporcional ao fator tempo. A espécie *S. sanguis* precisou de 3 semanas para invadir os túbulos dentinários nos 3 terços avaliados. A espécie *E. faecalis* não invadiu o interior dos túbulos antes de 2 semanas de incubação, entretanto, em todo o lúmen do canal radicular, havia pontos isolados de invasão bacteriana. *E. faecalis* invadiu a maior quantidade de túbulos dentinários após 3 semanas de incubação. Quanto às duas espécies anaeróbias estritas, com taxa de crescimento mais lento quando comparadas a *E. faecalis* e *S. sanguis*, os microrganismos estavam presentes mas em pequeno número e os túbulos dentinários não foram invadidos por eles nos tempos examinados.

Perez et al. (1993b) observaram a migração *in vitro* de micro-organismos não móveis no interior dos túbulos dentinários. *Streptococcus sanguis* (NCTC 7853), *Actinomyces naeslundii* (ATCC 10039) e *Prevotella intermedia* (NCTC 93336) foram analisados através de microscopia eletrônica de varredura. *S. sanguis*, coco Gram-positivo anaeróbio facultativo, foi cultivado em ágar TS (triptona de soja) e suspenso em TS caldo. *A. naeslundii*, bacilo Gram-positivo anaeróbio facultativo, foi cultivado em ágar chocolate e suspenso em Schaedler caldo enriquecido com vitamina K3. *P. intermedia*, bacilo Gram-negativo anaeróbio estrito, foi cultivado em ágar Schaedler e suspenso em Schaedler caldo. Todos os micro-organismos foram manipulados em condições anaeróbicas. Vinte e sete incisivos bovinos recém-extraídos foram armazenados em solução de hipoclorito de sódio 0,5% para descontaminação inicial. Os 5 mm finais e a coroa foram seccionados com o uso de disco diamantado, sob irrigação. O canal radicular foi alargado em 2 mm de diâmetro com auxílio de broca esférica carbide n. 2 e a camada de cimento foi totalmente removida com auxílio de broca carbide n. 5510, até obtenção final de um cilindro de 15 mm de comprimento. As raízes foram seccionadas, finalizando o preparo das raízes em 4 cilindros de 6 mm de diâmetro por 4 mm de altura. As amostras foram submetidas ao banho ultrassônico solução de EDTA 17% por 10 minutos, seguido de solução de hipoclorito de sódio 2,5% por mais 10 minutos, com banho final de solução salina tampão fosfato. As amostras foram então esterilizadas por 30 minutos em

autoclave a 121°C e na sequência, mergulhadas em TS caldo. Uma ponta de ultrassom estéril de 2 mm de diâmetro agitou o meio por 30 minutos (600W, 20 kHz). As amostras foram incubadas por 10 dias a 37°C e condições anaeróbias. Os primeiros 36 blocos de dentina foram inoculados com *S. sanguis*. Outros 36 blocos de dentina foram inoculados com *A. naeslundii* e os últimos 36 blocos, com *P. intermedia*. Cada tubo continha 2 amostras. O meio era trocado a cada 4 dias e a pureza das colônias era verificada. Vinte blocos eram removidos de cada cultura após 10, 20 e 28 dias de incubação, respectivamente. As amostras eram fixadas em glutaraldeído 2,5% por 30 minutos, desidratadas em concentração crescente de solução de etanol e seccionadas longitudinalmente. Na sequência, eram cobertas por uma fina camada de ouro de 200 nm de espessura e observadas em microscopia eletrônica de varredura. Após fixação em formol 10%, desmineralização com ácido cítrico 5% e desidratação em soluções de etanol, as amostras eram embebidas em parafina, seccionadas em slices de 5 micrômetros e analisadas em exame histológico com corante Brown e Brenn. 11 slices foram obtidos de cada amostra e analisados em microscopia óptica com aumento de 40x e 100x. Houve diferença estatística significativa somente entre os tempos de 10 e 20 dias. Após 10 dias de contaminação, *S. sanguis* penetraram 200 µm de profundidade. Após 20 e 28 dias, a profundidade de penetração foi de 600-792 µm. Em 10 dias de incubação, *A. naeslundii* cobriu toda a superfície do lúmen do canal radicular, entretanto, não penetrou para o interior dos túbulos. Após 20 e 28 dias, as bactérias estavam arranjadas em aglomerados na entrada dos túbulos dentinários, sem penetrá-los. E após 10, 20 e 28 dias, a contaminação de *P. intermedia* foi muito pequena na superfície do lúmen do canal radicular, sem nenhuma penetração para o interior dos túbulos dentinários. Apenas a *S. sanguis* foi capaz de penetrar para o interior dos túbulos dentinários. Isso pode ser explicado pela forma como o micro-organismo se agrupa. A organização do crescimento de *S. sanguis* se dá em formato de trem, em que as células crescem sem formar uma geometria de obstáculo que as impedem de penetrar no interior dos túbulos dentinários. Micro-organismos podem penetrar profundamente nos túbulos, de forma passiva, crescendo sob o meio que penetrou para o interior dos túbulos. Entretanto, o meio nutritivo pode não penetrar totalmente para o interior dos túbulos dentinários, muito menos ser renovado totalmente a cada troca do mesmo. Mesmo assim, é o suficiente para permitir colonização intratubular, já que bactérias podem estabelecer mecanismos de agregação, como síntese de dextranas e levanas, que facilitam a agregação e o crescimento e multiplicação das células (BOURGEAU & MCBRIDE, 1976). Em suma, as

diferenças de penetração observadas neste estudo mostram que o processo de contaminação intratubular depende não somente dos critérios anatômicos, mas também pela agregação interbacteriana.

Siqueira-JR et al. (1996) investigaram *in vitro* a penetração de bactérias anaeróbicas no interior de túbulos dentinários através de microscopia eletrônica de varredura. Foram utilizados incisivos bovinos com raízes completas. O terço apical e a coroa foram removidos perpendicularmente em relação ao longo eixo do dente, com um disco diamantado sob refrigeração. O canal radicular foi padronizado em diâmetro de 2 mm com broca carbide esférica n. 2. A camada de cemento foi removida com broca diamantada em alta rotação, com refrigeração. A amostra foi seccionada transversalmente obtendo 2 cilindros de 4 mm de altura. Os espécimes foram colocados dentro de frascos de vidro contendo 10% de solução de ácido cítrico por 3 minutos, sob agitação, para remoção da camada de smear layer. Na sequência, foram autoclavados por 20 minutos a 121°C e dispensados individualmente em tubos contendo BHI-PRAS caldo, enriquecido com hemina e metadiona. As amostras foram incubadas a 37°C por 1 semana, permitindo a penetração do caldo no interior dos túbulos dentinários. Os grupos foram divididos em 6 categorias: 6 tubos foram inoculados com *Porphyromonas endodontalis* (BN 1 la-f) , 6 tubos com *Fusobacterium nucleatum* (ATCC 10953) , 5 tubos com *Actinomyces israelii* (ATCC 12103), 6 tubos com *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277), 5 tubos com *Propionibacterium acnes* (isolado clínico) e 5 tubos com *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) como grupo controle. Todos os micro-organismos, anaeróbios estritos, exceto *E. faecalis*, anaeróbio facultativo, foram cultivados em condições anaeróbicas em BHI -PRAS. O meio era renovado a cada 3 dias e a pureza das culturas era constatada. Após a incubação de 21 dias, os espécimes foram preparados para análise em microscopia eletrônica de varredura de acordo com método descrito por Dykstra (1992). Os cilindros eram fixados em glutaraldeído 2,5% por 2 horas e lavados 3 vezes, 10 minutos cada lavagem com solução de cacodilato de sódio 0,2 M (pH 7.2), seguido de fixação em solução de 1% ósmio em tampão cacodilato por 30 minutos. Os espécimes eram lavados 3 vezes, seccionados longitudinalmente e secos em solução crescente de etanol, iniciando com 50% e terminando em 100% de concentração de etanol, por 10 minutos em cada solução. Os cilindros de dentina eram transferidos para frascos de vidro contendo acetona, desidratados em máquina de ponto crítico (Bio-Rad, E3000, Watford, Inglaterra), fixados em stubs e cobertos com camada de ouro.

Todas as bactérias deste experimento foram capazes de penetrar no interior dos túbulos dentinários em diferentes profundidades. Lúmen e túbulos dentinários foram invadidos pelas espécies *E. faecalis*, *P. acnes*, e *A. israelii*. A maioria dos túbulos, mas não todos, apresentava bactéria em profundidade. Poucos túbulos foram invadidos e colonizados pelo *P. gingivalis*. Entretanto, quando presente, era observado em grandes profundidades. *P. endodontalis* invadiu túbulos dentinários, mas a penetração foi restrita a uma pequena porcentagem ao redor do espaço da polpa dentinária. *F. nucleatum* colonizou lúmen do canal radicular e teve pouco poder de penetração, aparentemente pelo seu formato fusionado, mantendo-o preso na embocadura dos túbulos dentinários. Bactérias penetram no interior dos túbulos dentinários a partir de seu crescimento em meio de cultura. Entretanto, outro mecanismo pode ocorrer: bactérias crescem e se multiplicam no meio e conforme o meio penetra no interior dos túbulos dentinários, células bacterianas são levadas com ele de modo passivo. Características morfológicas como diâmetro dos túbulos, esclerose tubular, formato da bactéria, presença de apêndices como cápsula, pili ou fimbrias podem dificultar a invasão em profundidade. Os autores afirmaram que o uso de BHI caldo como meio nutritivo para *E. faecalis* não impediu crescimento bacteriano, contrariando estudo prévio de Haapasalo & Orstavick (1987). BHI caldo permitiu contaminação intensa e com bons resultados. As diferenças entre os meios de cultura utilizados em demais estudos está relacionada à espécie bacteriana, ao tempo de incubação, concentração e idade do inóculo.

Love (1996) investigou o padrão de infecção bacteriana por *Streptococcus gordonii*, no interior de túbulos dentinários. Treze dentes unirradiculares humanos foram selecionados para o estudo. Os elementos foram limpos, sem remoção da camada de cimento e padronizados através da eliminação da porção coronária. A patência dos condutos radiculares foi obtida com instrumento K #15, instrumentados na técnica ápice coroa com solução de hipoclorito de sódio 5,25% e EDTA 17%. O stop apical foi mantido a 1 mm aquém da saída foraminal e o diâmetro cirúrgico do canal radicular foi finalizado em 3 instrumentos de calibre maior que o diâmetro anatômico ou até a lima tipo K de #30. Os espécimes foram seccionados longitudinalmente em relação ao longo eixo, produzindo 2 metades. Na sequência, as amostras seccionadas foram submetidas ao banho ultrassônico por 4 minutos com solução de EDTA 17% e solução de hipoclorito de sódio a 5,25% e esterilizadas. O inóculo bacteriano foi preparado em caldo de levedura em densidade óptica de 2×10^8 UFC/ml. Os espécimes foram posicionados dentro de

microtúbulos e cobertos pelo inóculo. Os frascos foram incubados anaerobicamente a 37°C e a cada 3 dias, o meio era renovado. Após o período de 21 dias, os espécimes foram fixados em formalina tamponada, desmineralizados em ácido fórmico e formalina, neutralizados em carbonato de lítio e desidratados. Os espécimes foram seccionados nos 3 terços, montados em cera, corados com corante Brown & Brenn e analisados via microscopia óptica com aumento de 400x. Vinte túbulos infectados para cada terço era considerado de pouca contaminação. De 21 a 50 túbulos infectados, contaminação moderada e mais de 50 túbulos, era considerado contaminação intensa. Os terços cervical e médio exibiram um padrão de infecção bastante similar, caracterizado por uma contaminação superficial intensa envolvendo a maioria dos túbulos dentinários. Entretanto, a distribuição dos túbulos contaminados e a profundidade de penetração foram irregulares. A profundidade máxima de contaminação foi de 200 μm . A contaminação do terço apical, com fraca invasão bacteriana e com muitos túbulos dentinários livres de bactérias, mostrou-se estatisticamente significativa em comparação com os terços cervical e médio e a profundidade de penetração neste terço não excedeu 60 μm . Com a idade, a dentina peritubular torna-se mais mineralizada, com redução de tamanho do diâmetro e número dos túbulos (CARRIGAN et al, 1984). A média do número de túbulos em qualquer idade, nos terços cervical e médio é similar. Entretanto, a quantidade de túbulos dentinário no terço apical é consideravelmente menor. Isso explicaria a diferença no padrão de contaminação para cada um dos 3 terços. A concentração de gradiente é importante. Existe alto gradiente inicial entre inóculo e meio estéril em lúmen. O conteúdo dos fluidos se equilibram inicialmente em lúmen e a concentração de inóculo que alcança o interior dos túbulos dentinários é pequena, limitando o crescimento bacteriano intratubular. A taxa de difusão varia com relação a área. Se o diâmetro do túbulo dentinário próximo a câmara pulpar é de 2,5 μm e reduz para 0,9 μm para a periferia (GARBEROGLIO & BRANNSTRÖM, 1976), isso representa 64% de redução do raio do túbulo e 87% de redução de área de superfície. Logicamente, se a taxa de difusão é diretamente proporcional à área, quando há diminuição desta, há diminuição também da taxa de difusão. Assim, a contaminação dos túbulos dentinários por via passiva é dependente da taxa de difusão, do gradiente de concentração e área de superfície. A presença da camada superficial de cimento limita a penetração bacteriana para o interior dos túbulos dentinários a partir do lúmen do canal radicular.

Berkiten et al, (2000) investigaram a penetração de *S. sanguis* e *P. intermedia* nos túbulos dentinários da parede pulpar até a periferia, através de microscopia eletrônica de varredura e microscopia óptica. Vinte e oito incisivos centrais superiores humanos foram seccionados na porção coronária e apical com discos diamantados. A amostra remanescente teve o canal radicular instrumentado com auxílio de uma broca de Gates Glidden n. 3 e foi tratada com banho ultrassônico de EDTA 17% por 10 minutos, seguido de solução de hipoclorito de sódio 2,5% por igual tempo. A lavagem final foi feita com solução de tampão fosfato em pH de 7,2. As amostras foram autoclavadas por 20 minutos a 121°C. Na sequência, as amostras foram separadas em 2 grupos: contaminação por *S. sanguis* (NCTC 7853) em caldo de triptona de soja e contaminação por *P. intermedia* (NCTC 93336) em caldo Schaedler enriquecido com vitamina K. Ambos os inóculos foram ajustados em 10⁹ células/ml. O meio era substituído a cada 4 dias e todas as amostras foram incubadas por 20 dias a 37°C Após o 20º dia, alíquotas de ambos os grupos foram cultivadas em ágar de triptona de soja e Schaedler pelo método de subtração e as amostras foram fixadas em glutaraldeído 2,5% por 30 minutos, desidratadas em concentrações crescentes de etanol, limpas em solução de amilacetato e secas em máquina de ponto crítico. Na sequência, seccionadas longitudinalmente, recobertas com camada de ouro, foram observadas em microscópio eletrônico de varredura. Para os exames histológicos, parte das amostras foi fixada em formalina 10%, desmineralizada em ácido nítrico 5% e desidratada em solução de etanol. Embebidas em parafina, seccionadas em 20 slices de 5 µm de espessura, cada slice foi corado com Brown & Brenn e observadas em microscópio óptico com aumento de 20x e 40x. Foi observado crescimento seletivo de ambas as bactérias no ágar pelo método de subtração após o período de 20 dias. Ao microscópio óptico, a profundidade de penetração de *S. sanguis* mínima foi de 50 µm até no máximo de 880 µm. Para *P. intermedia*, a profundidade de penetração foi de no mínimo 0,1 µm e no máximo 275 µm. Ao microscópio eletrônico de varredura, houve grande crescimento de *S. sanguis*. A população de *P. intermedia* mostrou-se limitada e a maioria dos túbulos dentinários estavam vazios.

Love (2001) identificou o possível mecanismo que permite a *Enterococcus faecalis* sobreviver e colonizar o interior de túbulos dentinários, reinfectando canais radiculares obturados. Cepas de *Streptococcus gordonii* (DL1), *Streptococcus mutans* (NG8) e *Enterococcus faecalis* (JH2-2) foram cultivadas em TSBY ágar a 37°C em aerobiose

reduzida. Colônias foram suspensas em BHI caldo enriquecido com extrato de levedura (BHY caldo) por 16 horas a 37°C, em tubos fechados, sem agitação. Na sequência, o inóculo foi centrifugado a 6000 G por 10 minutos a 4°C e suspenso em BHI caldo contendo 15% de glicerol. Uma alíquota de 50 ul foi adicionada a 20 ml de BHY caldo estéril e incubados a 37°C. Solução ácido solúvel de colágeno tipo 1 e sêrum humano também foram padronizados. A cultura de cada microrganismo foi ajustada a $1,2 \times 10^9$ células e alíquotas de 10 ul de cada inóculo foram misturadas a 240 ul de BHY caldo, sêrum e BHY caldo contendo sêrum, seguido de incubação em tubos fechados, a 37°C por 56 dias. Densidade óptica de cada amostra era avaliada diariamente, até que o crescimento bacteriano fosse evidente. A cada dia, uma porção de líquido suspenso acima do agregado celular era plaqueada em ágar TSBY, incubada em meio anaeróbico e corada, para verificar a viabilidade das células e ausência de contaminação. Cerca de 100 dentes unirradiculares humanos coletados foi feita a padronização. Os elementos foram limpos, sem remoção da camada de cimento mas com eliminação da porção coronária. A patência dos condutos radiculares foi obtida com instrumento K #15, instrumentados na técnica ápice coroa com solução de hipoclorito de sódio 5,25% e EDTA 17%. O stop apical foi mantido a 1 mm aquém da saída foraminal e o diâmetro cirúrgico do canal radicular foi finalizado em 3 instrumentos de calibre maior que o diâmetro anatômico ou até a lima tipo K de #30. Os espécimes foram seccionados longitudinalmente em relação ao longo eixo, produzindo 2 metades. Na sequência, as amostras seccionadas foram submetidas ao banho ultrassônico por 4 minutos com solução de EDTA 17% e solução de hipoclorito de sódio a 5,25% e esterilizadas. Os espécimes eram cuidadosamente colocados no interior de tubos com o longo eixo seccionado virado para cima e eram mantidos submersos por 2 dias em BHY. Após o período, o caldo foi substituído por inóculo e mantinha-se a incubação por 14 dias. A cada 3 dias, parte do inóculo era removida até expor a superfície radicular do espécime e substituída por BHY caldo e pureza das culturas era monitorada. Em 1 grupo, solução de colágeno tipo 1 ácido solúvel foi adicionada ao meio. Em outro grupo, sêrum humano foi adicionado ao meio. Após o 14° dia, os espécimes foram fixados com formalina tamponada em pH 7, desmineralizados em ácido fórmico 10% contendo formalina 2%, neutralizados em carbonato de lítio, lavados, secos e montados em cera. Secções de 6 µm foram feitas na porção cervical dos espécimes e corados com corante Brown & Brenn para magnificação em 100x e 400 x em microscopia óptica. O crescimento de *S. mutans* e *S. gordonii* foi evidente em todos os meios testados após 24 horas. O crescimento de *E. faecalis* foi

evidente em BHY caldo puro e em BHY caldo contendo 10-60% de s rum após 24 horas, enquanto que seu crescimento em s rum puro ou em BHY caldo contendo 70-90% s rum foi evidente após 48 horas. Quanto   invasão bacteriana intratubular, todas as 3 espécies apresentaram intensa contamina o após os 14 dias. A adi o de colágeno livre tipo 1 ao BHY caldo retardou a penetra o intratubular das 3 espécies. A adi o de s rum humano ao BHY caldo dificultou a contamina o intratubular para *S. mutans* e *S. gordonii*, inibindo, mas não paralisando, a contamina o por *E. faecalis*. Assim, a presença de colágeno tipo 1 livre e de s rum humano reduzem a contamina o para interior dos túbulos dentinários pela liga o das células bacterianas a estas duas substâncias. Células de *S. mutans*, *S. gordonii* e *E. faecalis* ligam-se fortemente ao colágeno tipo 1 da dentina. Assim, presença de soluço colágeno tipo 1 livre competiu com o colágeno fixo da superfície dentinária pela liga o bacteriana. A presença de s rum adicionado ao BHY caldo foi responsável pelo aumento da sinergia de liga o entre *Enterococcus faecalis* ao colágeno tipo 1 presente na dentina.

Zapata et al, (2008) estudaram a viabilidade de bactérias presentes no interior de túbulos dentinários através da microscopia confocal de varredura. Cepas de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) foram cultivadas em BHI  gar por 24 horas. Na sequência, colônias foram suspensas em 3 ml BHI caldo e ajustada a 0.5 McFarland. Dez dentes bovinos foram seccionados em 2 a 3 mm abaixo da jun o amelocementária, removendo a coroa. Para padronizar o tamanho das raízes em 7-8 mm, o terço apical também foi removido. O diâmetro do canal radicular foi padronizado em 1,30 mm, com auxílio de broca de Gates Glidden n.5 e irriga o com soluço de hipoclorito de sódio a 1%. A camada de smear layer foi removida através de banho ultrassônico por 4 minutos com soluço de EDTA 17%, lavagem em água esterilizada por 10 minutos e estocagem em mesmo meio por uma semana. Os espécimes foram esterilizados a 121 C por 20 minutos e transferidos individualmente para um tubo contendo 3 ml de BHI caldo contaminado com 200 ul de inóculo ajustado por 21 dias. A cada 2 dias, o inóculo era substituído por BHI caldo fresco e teste de Gram era realizado para se confirmar a pureza da mistura. Após a contamina o, os espécimes foram lavados com 1 ml de soluço tampão de fosfato (PBS) para remo o de bactéria não aderida da superfície e clivados longitudinalmente. Após a fratura, os segmentos dentinários eram novamente lavados com 100 ul de PBS. Um grupo foi corado com 50 ul com diacetato de fluoresceína e 50 ul de iodeto de propídio; e outro grupo, corado com 50 ul de 0,01% de laranja de acridina.

Para ambas as técnicas, os espécimes foram incubados protegidos da luz por 10 minutos, e na sequência, lavados com solução de PBS por 1 minuto. As amostras então foram imediatamente analisadas no microscópio confocal de varredura. Este trabalho mostra, pela primeira vez, a viabilidade e não viabilidade metabólica de células bacterianas no interior de túbulos dentinários. A penetração bacteriana no interior dos túbulos dentinários variou entre 100 a 400 μm e o corante laranja de acridina mostrou a presença de RNA, confirmando atividade metabólica ativa no interior dos túbulos. Para os autores, ficou evidente que a invasão dentinária pelo *E. faecalis* é um processo ativo mediado pela divisão celular da própria bactéria. Exames de PCR não conseguem distinguir DNA de células viáveis ou não, característica importante para se determinar a microbiota endodôntica após os protocolos de desinfecção (YOUNG et al., 2007; COOK et al., 2007; GOMES et al., 2008; SASSONE et al., 2008).

Ma et al. (2011) avaliaram um novo método de contaminação *in vitro* de 1 dia para ser utilizado em modelos experimentais de descontaminação do canal radicular. Seis dentes hígidos humanos foram seccionados a 1 mm abaixo da junção cimento esmalte, padronizando o comprimento em 4 mm. Os canais radiculares dos blocos foram instrumentados até o diâmetro de uma broca de Gates Glidden n. 6. Cada bloco de dentina foi seccionado longitudinalmente com auxílio de cinzel e martelo a partir de sulcos de clivagem previamente estabelecidos. A superfície externa de cada semicilindro foi desgastada com auxílio de lixa de granulação 600, a fim de se obter espessura de 2 mm e para remover o cimento. Os espécimes foram ajustados com auxílio de uma broca carbide para encaixarem no fundo de um tubo com filtro, alcançando as medidas de 4x4x2 mm. A *smear layer* foi removida através de banhos ultrassônicos com solução de hipoclorito de sódio 5,25% e ácido cítrico 6%, por 4 minutos cada. Na sequência, os espécimes foram lavados com água estéril por 1 minuto. Cada hemisseção foi inserida no fundo de um tubo com filtro com a superfície pulpar voltada para cima. Todo e qualquer espaço entre a amostra e o tubo foi selado com resina composta. Cepa de *Enterococcus faecalis* VP3-181 foi cultivada em BHI ágar a 37°C *overnight*. As colônias foram suspensas em BHI caldo e a solução de inóculo foi ajustada no espectrofotômetro a 3×10^6 UFC/ml. Uma alíquota do inóculo preparado foi inserida dentro de cada tubo contendo as amostras, que foram centrifugados 2 vezes, por 5 minutos cada, em velocidades de 1400 G, 2000 G, 3600 G e 5600 G. A cada final do ciclo de centrifugação, o inóculo dentro dos tubos era descartado e renovado com solução fresca de bactérias.

Ao final, o inoculo era descartado e BHI caldo era inserido dentro dos tubos para incubação a 37°C por 24 horas. Para os protocolos de descontaminação com soluções de hipoclorito de sódio 1 e 6%, clorexidina 1 e 2% e Qmix, os espécimes foram removidos do tubo e lavados com água estéril por 1 minuto e secos ao ar livre. A camada externa da raiz foi selada com verniz de unha e os 12 espécimes foram divididos randomicamente em 6 grupos. Uma alíquota de 50 µl de cada solução foi depositada na superfície do lúmen canal radicular, com tempo de contato variando de 1 e 3 minutos, em repouso. Após tempo proposto, os espécimes foram lavados em água estéril por 1 minuto e fraturados longitudinalmente a partir do canal radicular, expondo a superfície a ser examinada via microscópio confocal de varredura. As amostras foram coradas com corante Live & Dead de acordo com as instruções do fabricante e lavadas com solução de tampão fosfato por 1 minuto. Para a avaliação da profundidade de penetração intratubular, as imagens foram reconstruídas em 3D com auxílio do software Imaris 7.2. As amostras foram analisadas em objetiva de 20x com zoom adicional de 2 x. A borda do lúmen do canal radicular e a superfície externa da dentina preparada foram inicialmente localizados. A partir destes 2 pontos, 5 posições foram randomicamente selecionadas para cada espécime, com profundidade de 0.5 µm, gerando um conjunto de imagens de 20 *slíces* por escaneamento que foram reconstruídos através do software Imaris 7,2. A dimensão aplicada foi de 0.70 x 0.70 mm. A penetração de *Enterococcus faecalis* no interior de túbulos dentinários a partir do canal radicular foi confirmada através de microscopia confocal de varredura. Infecção densa e homogênea espalhou-se para o interior dos túbulos dentinários em profundidades de até 500 µm. Solução de hipoclorito de sódio 1% eliminou 34% das bactérias nos primeiros 200 µm a partir do lúmen do canal radicular, durante os 3 minutos de exposição, enquanto que em 1 minuto de exposição, houve diminuição do número de bactérias em 24%. O efeito da clorexidina 2% foi comparado ao hipoclorito de sódio nas concentrações de 1% e 2%. A solução de hipoclorito de sódio a 6% eliminou 43% das bactérias em 1 minuto de ação e 63% quando em 3 minutos de ação. Qmix e hipoclorito de sódio 6% eliminaram mais bactérias no interior de túbulos dentinários após 1 minuto quando comparadas às demais soluções utilizadas.

Parmar et al. (2011) quantificaram bactérias vivas e mortas em profundidade no interior de túbulos dentinários de 18 dentes humanos monoradiculares através da microscopia eletrônica confocal. Os dentes foram inicialmente mantidos em etanol 70%

até o momento de uso. O cimento foi removido e a coroa foi seccionada na junção cimento esmalte. A patência dos canais radiculares foi alcançada com instrumento tipo K de 10 mm e as amostras foram lavadas em solução de hipoclorito de sódio 2% por duas horas para remoção de matéria orgânica. Na sequência, estocagem em solução salina até o momento de uso. O canal radicular foi preparado com instrumento ProTaper F2 em 1 mm aquém da saída foraminal visível clinicamente. Os 2 mm finais do terço apical foram removidos com auxílio de disco diamantado e os espécimes foram lavados por 30 minutos com solução de EDTA 17%, seguido de solução de hipoclorito de sódio por igual tempo. Os espécimes foram autoclavados em BHI caldo e na sequência, 12 deles foram contaminados com inóculo de *Enterococcus faecalis*, preparado em meio BHY. As amostras foram incubadas em 37°C e a troca de BHY caldo era realizada todos os dias por 7 dias. Após o 7 dias, o grupo experimental recebeu pasta de hidróxido de cálcio no interior do conduto que foi selado com cera. Os demais grupos permaneceram com e sem contaminação por *E. faecalis*. As 18 amostras foram novamente incubadas a 37°C por mais 7 dias. O corante Live & Dead foi diluído em solução salina 0,9% a fim de se obter concentração final de 10 µMol/L de SYTO9 e 60 µMol/L de iodeto de propídio. As amostras foram colocadas em tubos, contendo o corante, e mantidas sob ausência de luz por 30 minutos. O corante foi removido e as amostras foram lavadas 2 vezes em solução salina para remover o excesso de corante. O terço cervical foi então colado em uma superfície de acetato com cianoacrilato e as amostras foram individualmente dispostas dentro de um tubo de quartzo para espectrofotômetro. O tubo de quartzo então foi preenchido com metilmetacrilato e pressurizado para presa. Secções transversais de 1 mm de espessura foram obtidas a partir de serra de corte de precisão e analisadas em microscópio confocal. Foi observada profundidade de penetração máxima de 653 µm a partir do lúmen do canal radicular. Não houve diferença estatística significativa quanto ao padrão de distribuição de bactérias entre as secções radiculares equivalentes entretanto, a profundidade de penetração variou significativamente entre as secções de um mesmo dente, com maior penetração alcançada em terços cervical e médio e menor em terço apical. Os autores atribuem essa distribuição irregular à esclerose dentinária especialmente em terço apical (PAQUE et al., 2006) e ao arranjo dos túbulos nos diferentes terços.

Andrade et al (2015) avaliaram um novo método de contaminação de dentes *in vitro* através da análise de imagens de microscopia eletrônica confocal de varredura. O

total de 15 dentes bovinos foram divididos igualmente em 3 grupos, conforme o protocolo de contaminação a ser usado. Os dentes foram seccionados coronalmente a 12 mm a partir do ápice radicular e os 5 mm apicais foram removidos. O canal radicular foi padronizado com instrumento tipo K #120. As amostras foram lavadas em EDTA 17% e água deionizada e a camada radicular externa foi selada com duas camadas de verniz de unha e autoclavados a 121 °C. Cepas de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) foram então reativadas em BHI caldo e incubadas a 37°C por 24 horas e depois mais 24 horas após substituição do BHI caldo para se atingir crescimento exponencial. A cultura foi ajustada a 1 McFarland (3.10^8 UFC/ml). Os dentes do grupo A foram contaminados acorde Haapasalo & Orstavik (1987), com trocas diárias de BHI caldo contaminado, por 21 dias. Os dentes do grupo B foram contaminados de acordo com Ma et al. (2011), em sequência de centrifugação de 1400 G, 2000 G, 3600 G e 5600 G, em 2 ciclos cada velocidade, por um período de 5 minutos para cada ciclo. Solução de BHI caldo contaminado foi adicionado a cada término de centrifugação e ao final, os espécimes foram incubados em BHI caldo por 37°C por 24 horas. O grupo C foi contaminado acorde Andrade et al. (2015), iniciando com banho ultrassônico das amostras em BHI caldo por 15 minutos. Na sequência, 800 ul de inóculo previamente ajustado a 1 MC Farland e incubado por 7 horas é utilizado conforme descrito no protocolo do grupo B, seguindo a mesma sequência de centrifugações e tempo previsto. Ao final, o inóculo é substituído por BHI caldo, agitado em vórtex e incubado por 37°C por 24 horas. No segundo dia, após vórtex de 10 segundos, o BHI caldo é substituído por um novo, seguido de centrifugação a 3600G por 5 minutos a 25 °C, seguido de incubação a 37°C por 24 horas. No terceiro dia, um novo inóculo de *E. faecalis* é preparado e repetiu-se a sequência do primeiro dia. No quarto dia, repetiu-se o protocolo executado no segundo dia e no quinto dia as amostras foram removidas dos microtúbulos e examinadas no microscópio. Após os protocolos de contaminação, os dentes foram cortados longitudinalmente com auxílio de Isomet sob irrigação, depois lavados com solução de EDTA 17% e solução salina e por fim, corados com 30 ul de solução de Live & Dead por 20 minutos. As imagens de microscopia confocal de varredura foram obtidas a partir de 4 quadrantes pre estabelecidos para cada hemi secção, com auxílio do software BioImageL v 21. Para o grupo C, houve maior penetração bacteriana a partir do lúmen do canal radicular, maior densidade e homogeneidade além de maior quantidade de bactérias vivas quando comparado com os grupos B e A. Para o grupo A, o protocolo de contaminação resultou em grande quantidade de bactérias no interior dos túbulos dentinários, entretanto, a

análise por biovolume revelou bactérias mortas no interior dos túbulos. No grupo B, o protocolo de contaminação resultou em grande quantidade de bactérias mortas.

2. JUSTIFICATIVA

O presente estudo justifica-se considerando os seguintes fatores:

A padronização para análises quantitativas e qualitativas de estudos microbiológicos *in vitro* aplicados à endodontia, antes e após protocolos de desinfecção, ainda é um desafio. A quantidade de túbulos dentinários preenchidos por biofilme bacteriano e a profundidade de penetração alcançada pelos microrganismos ainda não está bem estabelecida na literatura.

- As pesquisas de Microbiologia aplicada à Endodontia propõe-se a desenvolver protocolos e terapias complementares ao tratamento convencional estabelecido. Para tal, se faz necessário entender, conhecer e melhorar os protocolos *in vitro* que serão testados futuramente.
- A literatura mostra protocolos e terapias complementares para vários modelos de contaminação *in vitro*. Dessa forma é interessante entender de forma padronizada e portanto, comparável e fidedigna, a quantidade de microrganismos presentes no interior do lúmen e dos túbulos dentinários e da sua capacidade de penetração.

3. OBJETIVOS E HIPÓTESES

3.1 Objetivo Geral

- Verificar e comparar *in vitro*, três protocolos de contaminação previamente estabelecidos na literatura, através da quantificação microbiológica presente no lúmen do canal e nos túbulos dentinários.

3.2 Objetivos Específicos

Nos três métodos de contaminação *in vitro* avaliados:

- Verificar e comparar, através da contagem das unidades formadoras de colônias (UFC's), o número de microrganismos viáveis no lúmen dos canais radiculares;
- Verificar e comparar, através da contagem das unidades formadoras de colônias (UFC's), a penetração de microrganismos viáveis no interior dos túbulos dentinários
- Avaliar, quantificar e comparar a presença de micro-organismos nos terços cervical, médio e apical.

3.3 Hipótese

- A metodologia de contaminação de 21 dias descrita previamente por Haapasalo & Orstavik (1987) permite identificar nos terços cervical, médio e apical, uma maior quantidade de células bacterianas e uma maior penetração no interior de túbulos dentinários.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Autorização para Realização da Pesquisa e Considerações Éticas

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEPSH), da Universidade Federal de Santa Catarina sob o número 5.610.946.

4.2 Local de Realização da Pesquisa

O estudo foi realizado em parceria com o laboratório de Genética Molecular Bacteriana da Universidade Federal de Santa Catarina – GeMBac/MIP/CCB/UFSC.

4.3 Delineamento do Estudo

Estudo experimental *in vitro*

4.4 Seleção da Amostra

Para este estudo experimental *in vitro*, foram selecionados 58 dentes pré molares inferiores humanos permanentes, unirradiculares e com canal central único. Para o cálculo amostral, utilizou-se o *software* G*Power (Düsseldorf, Alemanha) assimilando teste estatístico referente à análise de variância para amostras independentes (ANOVA One Way) para os 3 grupos. O efeito ajustado foi de 0,95, valor de $\alpha = 0,05$ (5%) e poder $b = 0,80$ (80%). Os pré molares, foram distribuídos em 3 grupos ($n = 16$) de acordo com o protocolo de contaminação realizado. Além disso, 10 dentes foram utilizados para confirmar os protocolos e para repetição, se necessário.

Os voluntários assinaram o Termo de Cessão (ANEXO I) e o Termo de Consentimento Livre Esclarecido – TCLE (ANEXO II). Todos os dentes foram extraídos e cedidos por pacientes da Universidade Federal de Santa Catarina ou provenientes de consultórios particulares. As extrações foram por indicação clínica, sob autorização expressa dos pacientes que assinaram TCLE e o termo de cessão dos dentes.

Os critérios de inclusão foram: rizogênese completa, raiz e câmara pulpar íntegras, presença de canal radicular único e reto. Os dentes foram radiografados em incidência orto e méso radial para confirmar a presença de um único canal radicular. Os critérios de exclusão foram: reabsorções radiculares, trincas ou fraturas radiculares e casos em que não foi possível obtenção de patência foraminal. Presença de cáries, restaurações diretas e fraturas coronárias eram avaliadas para a possibilidade do dente ser incluído na amostra.

4.5 Preparação e Padronização das Amostras

Os dentes extraídos foram armazenados em recipiente de vidro âmbar, imersos em solução de hipoclorito de sódio a 1% (PECORA et al., 1997; ANDRADE et al., 2015) por 30 minutos, com o objetivo de promover descontaminação inicial dos espécimes. Posteriormente, os dentes foram limpos com auxílio de curetas periodontais (Hu-Friedy, Chicago, Illinois, EUA), lavados em água corrente e transferidos para outro recipiente repleto de solução salina 0,9% para prevenir ressecamento e craquelamento dentinário. Para padronizar o tamanho das amostras, foi feito um corte perpendicular ao longo eixo do dente, com o auxílio de disco diamantado de duplo corte 7016 (KG Sorensen, Barueri, São Paulo, Brasil), a 250 RPM, sob refrigeração, em 15 mm medidos a partir do ápice

radicular. Na sequência, espécimes foram sulcados com disco de carborundum (American Burs, Palhoça, Santa Catarina, Brasil) a cada 5 mm, também medidos a partir do ápice radicular, em sentido vestibular e lingual, com profundidade de 1.5 mm, demarcando pontos de clivagem (CHIVATXARANUKUL et al., 2008), conforme Figura 1.



FIGURA 1: Padronização das amostras

Inicialmente, foi realizada a manobra de *glide path* (PLOTINO et al., 2020) e patência do canal radicular em todos os espécimes, com instrumento tipo K # 10 e # 15 de 21 mm (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça) até que a ponta do instrumento fosse visualizada no forame apical. A partir desta medida, foi considerado o comprimento de trabalho (CT) no limite 0, ou seja, no forame radicular.

Na sequência, a padronização do diâmetro do canal radicular foi realizada com uso de uma lima Reciproc R25 (25/0,08) de 21 mm (VDW, GmbH, Munique, Alemanha) em velocidade recomendada pelo fabricante de 300 rpm, no CT previamente estabelecido. Esta manobra padronizou o terço apical radicular em diâmetro de 0,25; 0,33; 0,41 e 0,49 mm a partir do forame apical. Tal manobra favorece o fluxo de solução da cultura de *Enterococcus faecalis* por toda a extensão do trajeto do canal radicular (RACE et al., 2019). A cada movimento de bicada e avanço de pequena amplitude, o instrumento foi

removido do canal radicular e limpo em gaze esterilizada. A irrigação foi realizada com 3mL de solução de hipoclorito de sódio a 2,5% (Asfer, São Caetano do Sul, São Paulo, Brasil) e a recapitulação com instrumento manual tipo K#10 (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça) para evitar entupimento por debris dentinários e restos pulpares que poderiam desviar o trajeto original do canal radicular. Durante toda a instrumentação, os dentes foram mantidos em gaze esterilizada umedecida com solução salina 0,9% (Eurofarma, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil) a fim de se evitar a desidratação dos mesmos. Após a instrumentação, um cone de guta percha Reciproc R25 (VDW, GmbH, Munique, Alemanha) foi posicionado no interior do conduto a fim de avaliar total adaptação (HAUPT et al., 2018). Dentes que apresentaram canal radicular com diâmetro maior que instrumento R25 foram descartados.

A *smear layer* formada durante a instrumentação mecânica do canal radicular foi removida, lavando-se os espécimes em banhos ultrassônicos sequenciais de solução de EDTA trissódico 17% e pH neutro (Asfer, São Caetano do Sul, São Paulo, Brasil) por 10 minutos, seguido de solução de hipoclorito de sódio 2,5% por mais 10 minutos. Depois, mais 10 minutos de banho ultrassônico em solução salina 0,9% (Eurofarma, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil) para remoção de resíduos de EDTA e de solução de hipoclorito de sódio 2,5% (PEREZ et al., 1993a; FERRAZ, et al., 2001). A remoção da camada de *smear layer* torna as paredes dentinárias mais permeáveis à penetração de microrganismos via difusão de inóculo (GUTIÉRREZ et al., 1982; PETERS et al., 2000).

Os dentes selecionados para esta pesquisa foram divididos de acordo com a análise a ser realizada, sendo 16 dentes utilizados para cada um dos 3 grupos experimentais caracterizados pelos diferentes protocolos de contaminação *in vitro*. As Tabelas 1 e 2 detalham essa divisão.

48 dentes: grupos experimentais	n = 16 – protocolo de contaminação de 1 dia
	n = 16 – protocolo de contaminação de 5 dias
	n = 16 – protocolo de contaminação de 21 dias

TABELA 1: Divisão de dentes para cada grupo experimental

10 dentes:	n = 3: confirmação da remoção da smear layer por MEV
confirmação de metodologias	n = 3: confirmação contaminação dos túbulos dentinários por MEV n = 4: dentes extras para repetição, caso necessário

TABELA 2: Divisão de dentes para confirmação de metodologias

4.5.1 Primeira Análise em Microscopia Eletrônica de Varredura

Após o preparo e padronização das amostras, três espécimes foram selecionados randomicamente para análise por microscopia eletrônica de varredura MIRA 3 TESCAN (Universidade de Michigan, EUA) a fim de se verificar a remoção de *smear layer* em lúmen, embocadura e interior de túbulos dentinários. Assim, os espécimes selecionados foram fragmentados nos sulcos em 3 blocos de 5 mm cada: apical, médio e cervical com o auxílio de um cinzel e martelo de borracha.

As fatias correspondentes aos terços radiculares foram fixadas com glutaraldeído 2,5% tamponado com cacodilato de sódio 0,2M por 48 horas. Na sequência, as amostras foram lavadas com cacodilato de sódio por dez minutos e imersas em solução de cacodilato de sódio 0,1M por uma hora. Depois, foram lavadas com cacodilato de sódio em três sequências de vinte minutos cada. Foi feita lavagem final com água deionizada e desidratação em crescente de concentrações de etanol (30, 50, 70, 90 e 100%). Os corpos de prova ficaram por 10 minutos em cada solução. Ao final, as amostras foram levadas a estufa para secagem total por 48 horas. A montagem foi feita em *stubs*, com recobrimento de fina camada de ouro (300 A) previamente à análise sob microscopia eletrônica de varredura, confirmando a remoção de *smear layer* em lúmen, embocadura e interior de túbulos dentinários (DYKSTRA, 1992).

Confirmada a efetividade da remoção da *smear layer*, a região apical foi selada com o propósito de simular um sistema de canais radiculares fechados.

Para este procedimento, foi feito o condicionamento com ácido fosfórico 37% (PHS do Brasil, Joinville, Santa Catarina, Brasil) por 30 segundos. Na sequência, foi feita lavagem abundante da superfície radicular externa e do canal radicular com solução salina estéril 0,9%. Posteriormente, foi realizada a etapa de secagem com auxílio de gaze esterilizada. Na sequência, duas camadas de adesivo (3M ESPE, St. Paul, EUA) foram

depositadas com auxílio de pincel aplicador tipo *microbrush* (Technobrush – Vigodent Coltene, Rio de Janeiro, Brasil), seguido de fotoativação por 20 segundos (Radii Plus, SDI, Victoria, Australia). Finalmente, foi feita a aplicação de resina composta fotopolimerizável Filtek Z250 XT (3M, Sumaré, São Paulo, Brasil) com fotopolimerização de 40 segundos (RUEGGBERG et al., 2017).

A camada externa radicular foi recoberta com 2 camadas de esmalte de unha na cor vermelha (Mavala, Geneva, Suíça) e secos ao ar livre por 24 horas, conforme Figura 2. Na sequência, os espécimes foram colocados individualmente dentro de microtubos de 2 ml (Eppendorf Tubes, Eppendorf SE, Hamburgo, Alemanha) contendo 1 ml caldo Brain Heart Infusion (BHI) (Kasvi, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil), autoclavados a 121°C, 1 atm, por 15 minutos e incubados a 37 °C por 24 horas em aerobiose. Assim, verificou-se a ausência de turbidez do meio e confirmação da esterilidade (modificado de HAAPASALO & ORSTAVIK, 1987; FERRAZ et al., 2001; MARINHO et al., 2015).

A partir desta etapa, todos os procedimentos foram realizados em câmara de fluxo laminar de nível de biossegurança NB2 (Veco, Campinas, São Paulo, Brasil)



FIGURA 2: selamento ápice radicular e túbulos dentinários

4.6 Preparo da Suspensão de Bactérias

Utilizou-se a cultura pura de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) isolada do trato urinário. O *Enterococcus faecalis* foi reativado em caldo Brain Heart Infusion (BHI) (Kasvi, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil) e incubado em estufa em temperatura de 37 °C por 24 horas. Na sequência, colônias isoladas foram plaqueadas em Brain Heart Infusion Agar - BHI Agar (Kasvi, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil), conforme Figura 3. Depois, um tubo de 50 ml contendo BHI caldo estéril foi contaminado com colônias selecionadas e isoladas de *Enterococcus faecalis* e a densidade ajustada em espectrofotômetro (Hach, Loveland, Colorado, EUA), com comprimento de onda de 600 nm, equivalente a 1.0 na escala de McFarland (3×10^8 UFC/ml).

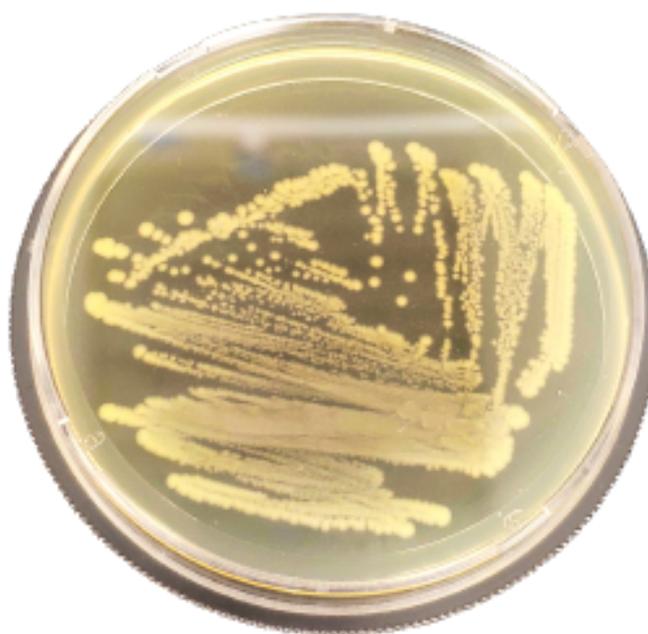


FIGURA 3: Esgotamento de cepa de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212).

4.7 Contaminação das Amostras

Foram testados 3 protocolos de contaminação *in vitro*: tempo de contaminação de 1 dia (MA et al., 2011), 5 dias (ANDRADE et al., 2015) e de 21 dias (HAAPSALO & ORSTAVIK, 1987). A metodologia relacionada a composição do meio de cultura, coletas e análises de amostras microbiológicas deste trabalho foram baseadas em estudos prévios

de Orstavik & Haapasalo (1990), Gomes et al. (1994^{ab}), Gomes et al. (1996), Gomes et al. (2004), Gomes et al. (2006), Martinho & Gomes (2008) e Siqueira-Jr et al. (1996).

4.7.1 Protocolo de Contaminação de 1 dia

O protocolo de contaminação dos dentes descrito a seguir é baseado nos estudos prévios de Ma *et al.* (2011). O inóculo contaminante previamente ajustado na escala 1,0 de MC Farland (3×10^8 UFC ml⁻¹) foi utilizado. Os microtubos contendo os dentes tiveram seu meio estéril descartado. Depois, uma alíquota de 850 ml da solução contaminante foi inserida nos microtubos. Esses, foram dispostos em uma centrífuga multirrotor (Kasvi, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil) e centrifugados a 1200 G, 2400 G, 3500 G e 5400 G, duas vezes cada, com duração de 5 minutos. A cada nova centrifugação, o inóculo ajustado a 1 Mc Farland era renovado. Ao final, 1 ml de BHI caldo estéril substituiu o inóculo e os tubos foram novamente incubados a 37 °C por 24 horas em aerobiose. Foram realizados testes Gram e catalase para verificar a presença exclusiva de *Enterococcus faecalis* como único microrganismo presente no meio.

4.7.2 Protocolo de Contaminação de 5 dias

O protocolo de contaminação dos dentes descrito a seguir é baseado nos estudos prévios de Andrade *et al.* (2015). Os espécimes esterilizados foram dispostos em microtubos contendo 1 ml de BHI caldo e foram submetidos ao banho ultrassônico por 15 minutos, com o objetivo de facilitar a penetração do caldo no interior dos túbulos dentinários. O primeiro dia é descrito exatamente como o protocolo de contaminação de 1 dia descrito no item 4.7.1. Ao final, 1 ml de BHI caldo estéril substituiu o inóculo e os tubos foram submetidos a vórtex (Vortex Basic, Kasvi, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil) antes da incubação a 37 °C por 24 horas em aerobiose. No segundo dia, os tubos foram submetidos a vórtex por 10 segundos e o inóculo era descartado. Uma alíquota de 1 ml de BHI caldo preencheu os microtubos que foram centrifugados a 3500 G por 5 minutos e incubados a 37 °C por 24 horas em aerobiose. No terceiro dia, a sequência é idêntica ao do primeiro dia e no quarto dia, a sequência é como no segundo dia. Ao final do quinto dia, a contaminação foi verificada pela presença de turbidez do meio. Foram realizados

testes Gram e catalase para verificar a presença exclusiva de *Enterococcus faecalis* como único microrganismo presente no meio.

4.7.3 Protocolo de Contaminação de 21 dias

O protocolo de contaminação dos dentes descrito a seguir é baseado nos estudos prévios de Haapsalo & Orstavick (1987). Os espécimes esterilizados foram dispostos em microtubos contendo 1 ml de BHI caldo (SIQUEIRA JR et al. 1996) e foram submetidos ao banho ultrassônico por 10 minutos. Uma alíquota de 850 ml de inóculo previamente ajustado a 1 Mc Farland preencheu o microtubo contendo o espécime. Na sequência, os microtubos foram incubados a 37 °C por 24 horas em aerobiose.

Foram feitas trocas diárias de metade do conteúdo contaminado de cada tubo por caldo BHI estéril, para evitar saturação do meio. O crescimento bacteriano foi verificado pela presença da turbidez do meio, ao final do 21° dia. Foram realizados testes de Gram e catalase a cada 2 dias para verificar a presença exclusiva de *Enterococcus faecalis* como único microrganismo presente no meio.

4.8 Segunda Análise em Microscopia Eletrônica de Varredura

Após contaminação das amostras, três espécimes (1 de cada grupo) foram selecionados randomicamente para análise por microscopia eletrônica de varredura MIRA 3 TESCAN (Universidade de Michigan, EUA) a fim de se verificar a presença única e exclusiva da espécie bacteriana *Enterococcus faecalis* em lúmen, embocadura e interior de túbulos dentinários, descartando a hipótese de contaminação (Figura 4). O preparo das amostras seguiu o mesmo protocolo descrito anteriormente no item 4.5.1.

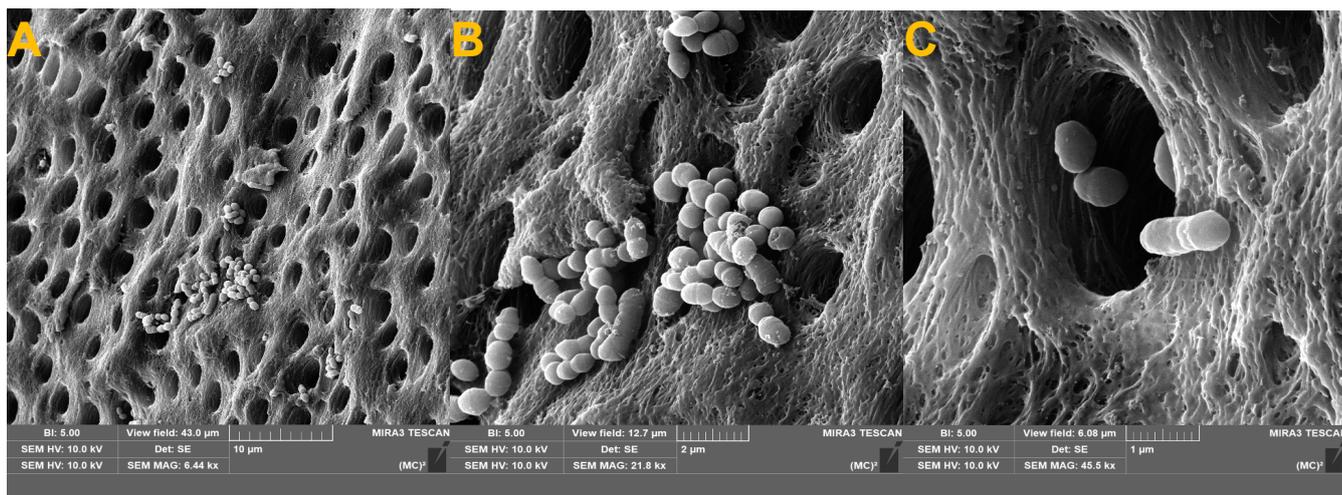


FIGURA 4: Eletrofotomicrografias da embocadura de túbulos dentinários em aumentos de 6400x (A), 28000x (B) e 45000x (C).

4.9 Coleta Microbiológica do Lúmen do Canal Radicular

Os espécimes foram dispostos em uma plataforma metálica estéril, em posição vertical, conforme Figura 5.



FIGURA 5: espécime em posição vertical, com cone de papel absorvente em posição.

Para a realização das coletas, 1 cone de papel absorvente estéril R25 (VDW, Munique, Alemanha) foi colocado no interior do canal radicular, após irrigação com 3 ml de solução salina 0,9% estéril para remoção das bactérias planctônicas. O cone atingiu o CT e ficou em contato com as paredes radiculares por 1 minuto. Na sequência, o cone de papel foi transferido para um microtubo individual contendo 1000 μ l de BHI caldo estéril. Imediatamente após cada coleta, os microtubos foram agitados (Vortex Basic, Kasvi, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil) por 30 segundos e o conteúdo diluído em série 1/10 (10^{-1}), 1/100 (10^{-2}), 1/1000 (10^{-3}) e 1/10000 (10^{-4}) em BHI caldo estéril (Kasvi, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil). Uma alíquota de 20 μ L das diluições 10^{-2} e 10^{-4} e da mãe foram plaqueadas em duplicatas em BHI ágar (Kasvi, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil) pelo método de microplaqueamento (ROGOSA et al., 1951; WESTERGREEN & KRASSE, 1977; NAGHILLI et al., 2013), conforme Figura 6. Após a secagem das gotas, as placas foram incubadas em condições aeróbicas, a 37° C por 24 horas.



FIGURA 6: técnica de microplaqueamento

Terminado o período de incubação, as colônias de microrganismos presentes nas placas (unidades formadoras de colônia – UFCs) foram contadas. A contagem foi realizada três vezes em cada placa de Petri pelo mesmo operador, previamente calibrado. Um segundo avaliador repetiu a contagem, 3 vezes em cada placa, para confirmar os valores obtidos pelo primeiro (BELLO et al., 2018). Ambos os avaliadores passaram por calibração até o teste Kappa de Cohen sugerir uma concordância quase perfeita (0.80-1.00). A pureza das culturas foi confirmada através da morfologia das colônias, coloração de Gram e teste de catalase.

4.10 Coleta Microbiológica do Interior dos Túbulos Dentinários

Após as coletas do lúmen do canal, as amostras foram fragmentadas em 3 blocos de 5 mm cada: apical, médio e cervical com o auxílio de um cinzel e martelo de borracha.

Cada bloco foi fixado na plataforma metálica estéril para a remoção sequencial de raspas de dentina a partir da superfície da luz do canal, conforme Figuras 7 e 8.

Para isso, foram utilizadas 3 brocas tronco cônicas diamantadas estéreis de diâmetro crescente para cada um dos terços: 3069 (broca 1/ISO 018) cujo maior diâmetro é de 1,8 mm; 3139 (broca 2/ ISO 021) cujo maior diâmetro é 2,1 mm; e 4137 (broca 3/ ISO 025) cujo o maior diâmetro é de 2,5 mm (KG Sorensen, Barueri, São Paulo, Brasil) (Figura 9).



FIGURA 7: plataforma metálica estéril – morsa em série

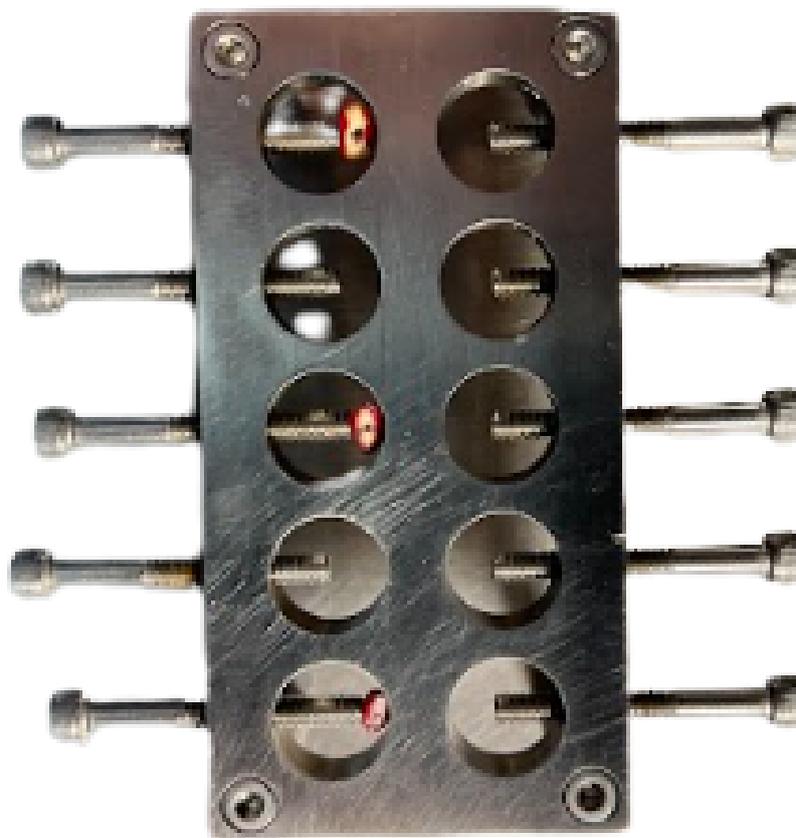


FIGURA 8: blocos dos três terços dispostos em plataforma metálica estéril



FIGURA 9: Desgaste dos terços através do uso de brocas tronco cônicas. Coleta de raspas dentinárias em tubo com BHI caldo estéril.

Cada broca corresponde a uma profundidade de desgaste nos túbulos dentinários, a partir do lúmen do canal radicular. Todas as brocas utilizadas foram acopladas em caneta de baixa rotação em motor elétrico 1:1 (NSK NLX-Nano, Toquio, Japão). As brocas diamantadas tronco cônicas foram utilizadas de forma sequencial, da menor broca para a maior, em movimento de bicada, penetrando 3 vezes no interior do conduto de cada um dos terços, em profundidade de 4 mm. Para cada terço (cervical – C, médio – M e apical – A), foram utilizadas três brocas, obtendo 3 níveis de profundidade diferentes (1, 2 e 3), considerando o maior diâmetro de cada terço alcançado depois da padronização do canal radicular com Reciproc R25, conforme Figuras 10, 11, 12 e 13. O valor do maior diâmetro da parte ativa de cada broca (ISO) foi descontado do maior diâmetro possível do lúmen do canal radicular em cada terço, obtido a partir da calibração prévia de cones de guta percha Reciproc R25 com auxílio de régua endodôntica (HAUPT et al., 2018). Desta forma, foi possível calcular, aproximadamente, as medidas máximas de penetração a partir do lúmen para o interior dos túbulos dentinários, para cada broca em cada terço. Os debris dentinários coletados foram pesados em balança de precisão (BERBER et al., 2006), padronizando 20 mg para todas as coletas conforme Figura 14. No presente estudo, as raspas de dentina foram coletadas em tubos que continham BHI caldo e não solução salina ou meios de transporte como RTF ou VMGAIII. O meio de cultura é capaz de permitir e suportar o crescimento da *Enterococcus faecalis* (GOMES et al 2001, 2003).

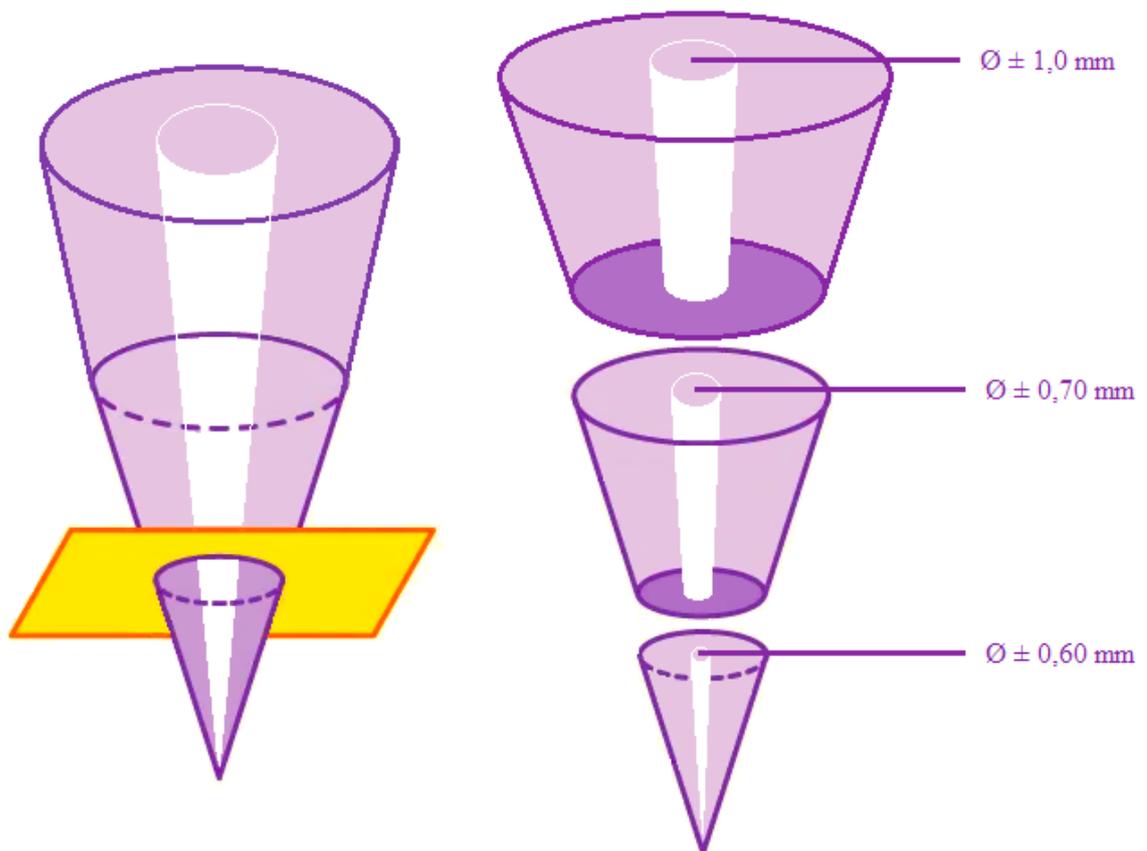


FIGURA 10: Representação dos maiores diâmetros do lúmen do canal radicular, em cada terço, após padronização com instrumento Reciproc R25 (25/0,08).

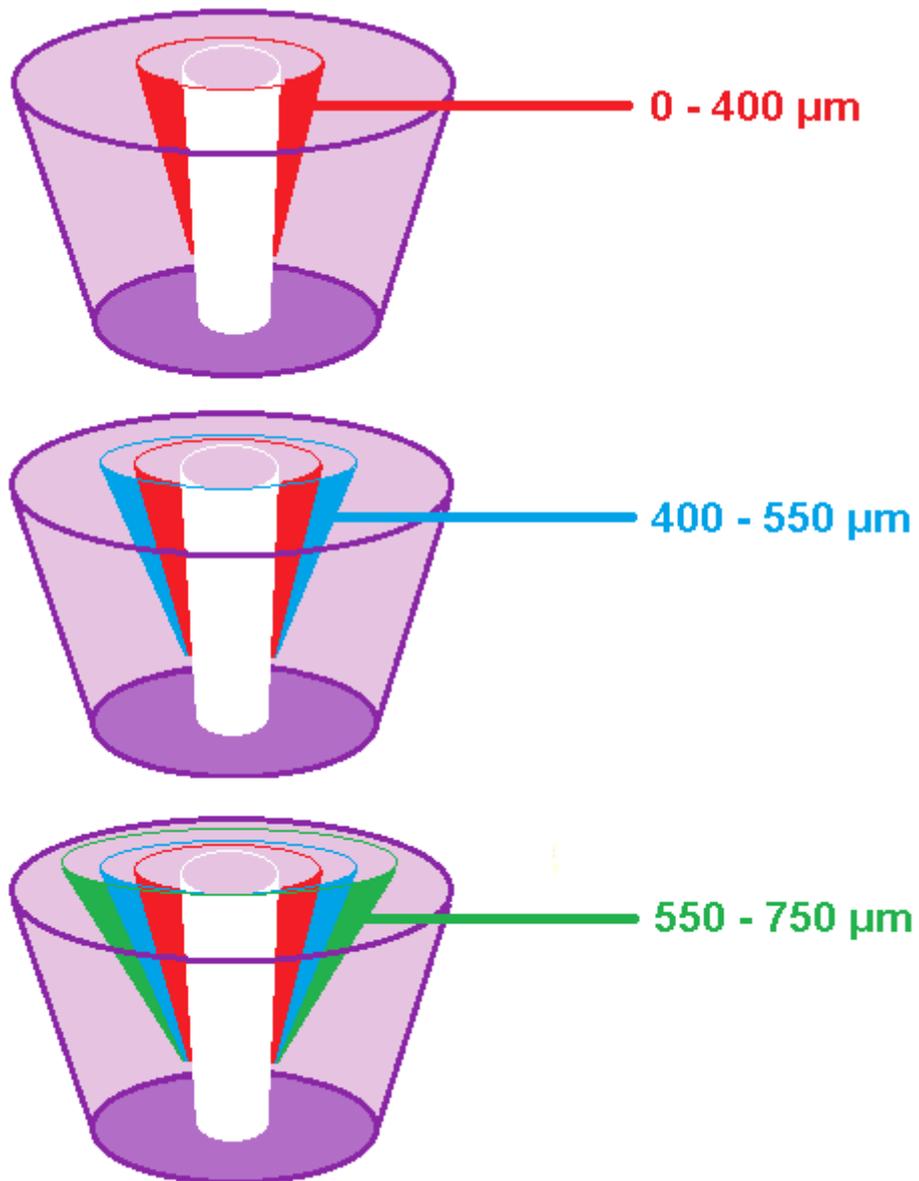


FIGURA 11: terço cervical – representação dos níveis de profundidade a partir do lúmen obtidos pelo uso sequencial das brocas 3069 (broca 1/ISO 018), 3139 (broca 2/ ISO 021) e 4137 (broca 3/ ISO 025).

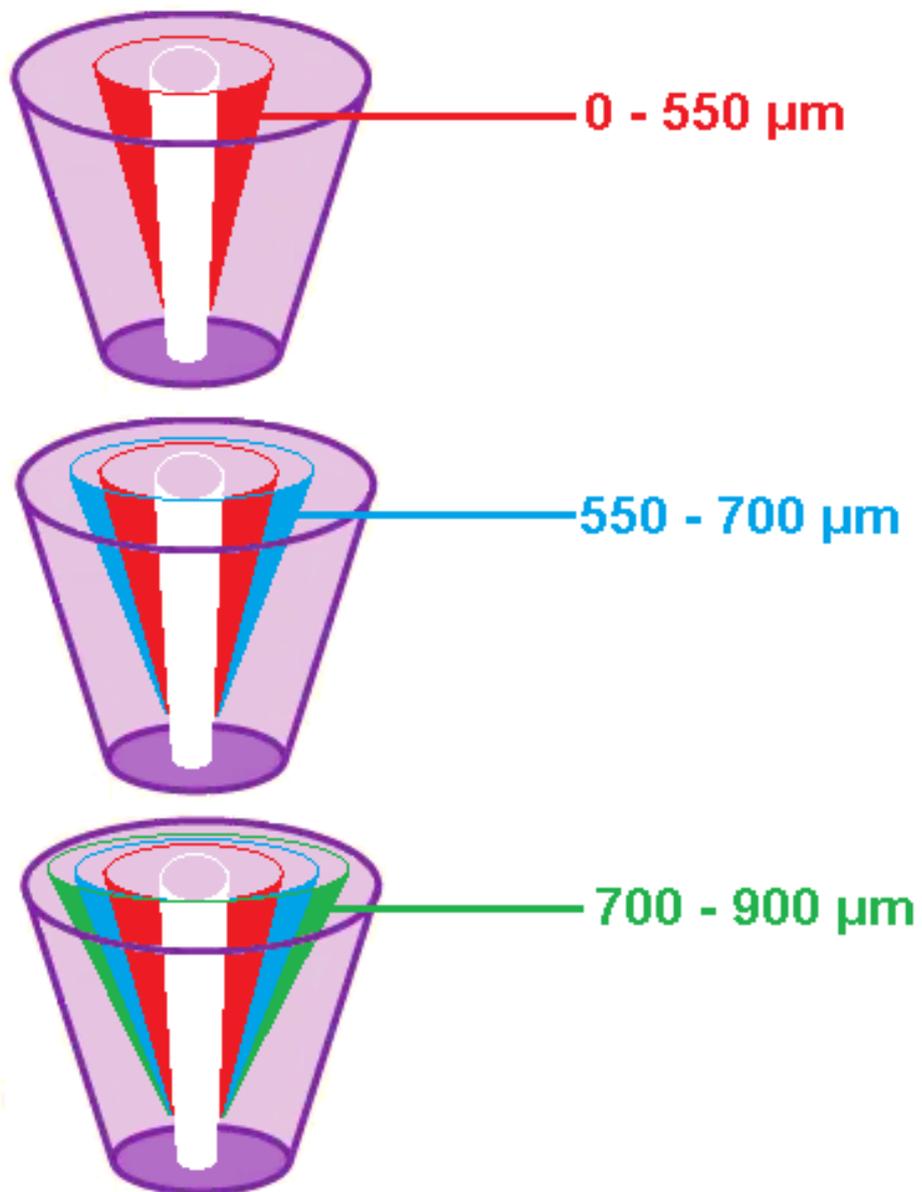


FIGURA 12: Terço Médio – representação dos níveis de profundidade a partir do lúmen obtidos pelo uso sequencial das brocas 3069 (broca 1/ISO 018), 3139 (broca 2/ ISO 021) e 4137 (broca 3/ ISO 025).

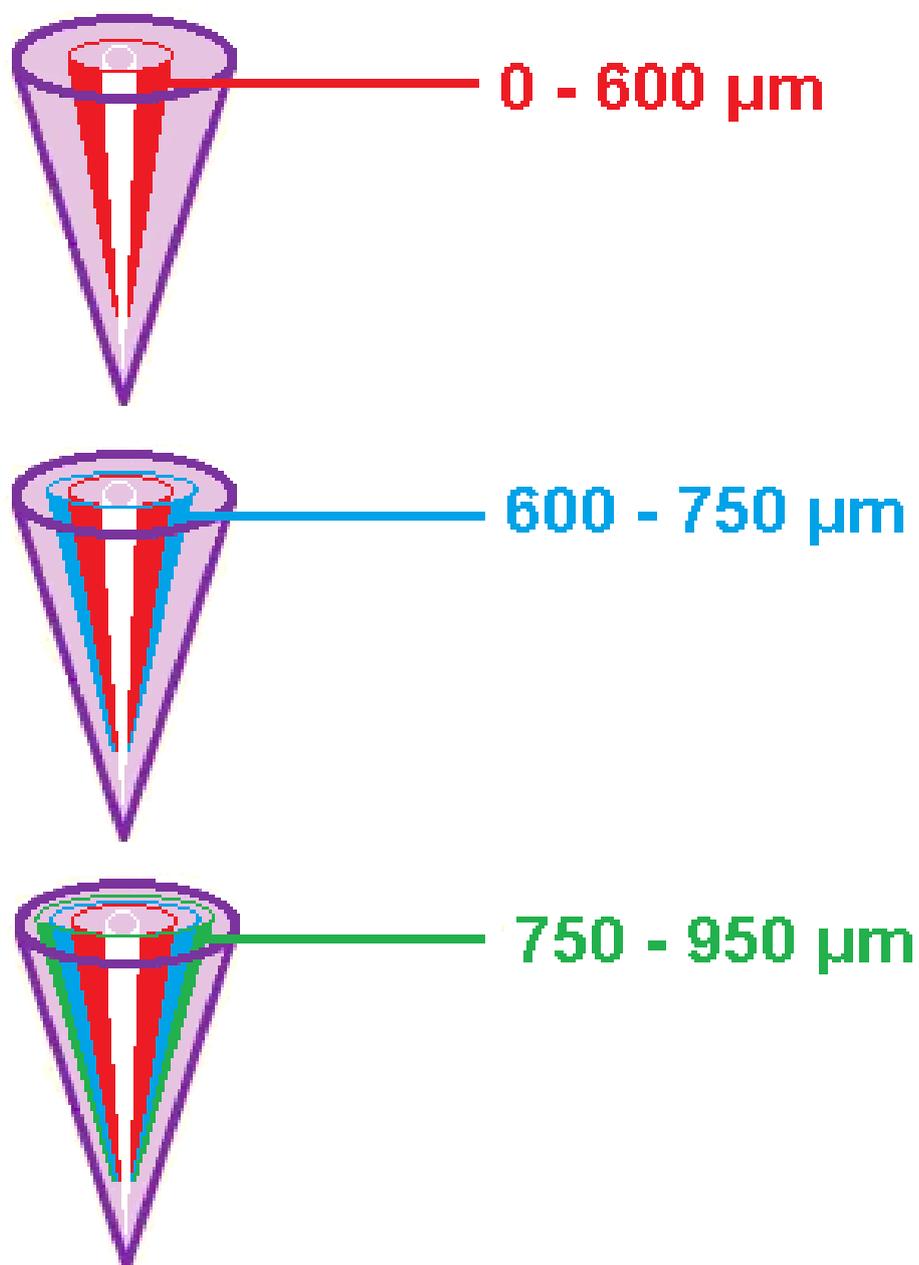


FIGURA 13: Terço Apical – representação dos níveis de profundidade a partir do lúmen obtidos pelo uso sequencial das brocas 3069 (broca 1/ISO 018), 3139 (broca 2/ ISO 021) e 4137 (broca 3/ ISO 025).



FIGURA 14: Pesagem. A: tara – referente ao frasco contendo 1000 ul de BHI caldo; B: Pesagem do pó dentinário coletado.

As raspas de dentina obtidas durante o uso de cada broca foram coletadas em frascos de vidro esterilizados contendo 1000 ul de BHI caldo estéril. As amostras foram então agitadas (Vortex Basic, Kasvi, São José dos Pinhais, PR, Brasil) por 30 segundos, diluídas em série e plaqueadas pelo método de gota para a contagem das unidades formadoras de colônia, conforme metodologia descrita no item 4.9 e Figuras 15, 16 e 17.

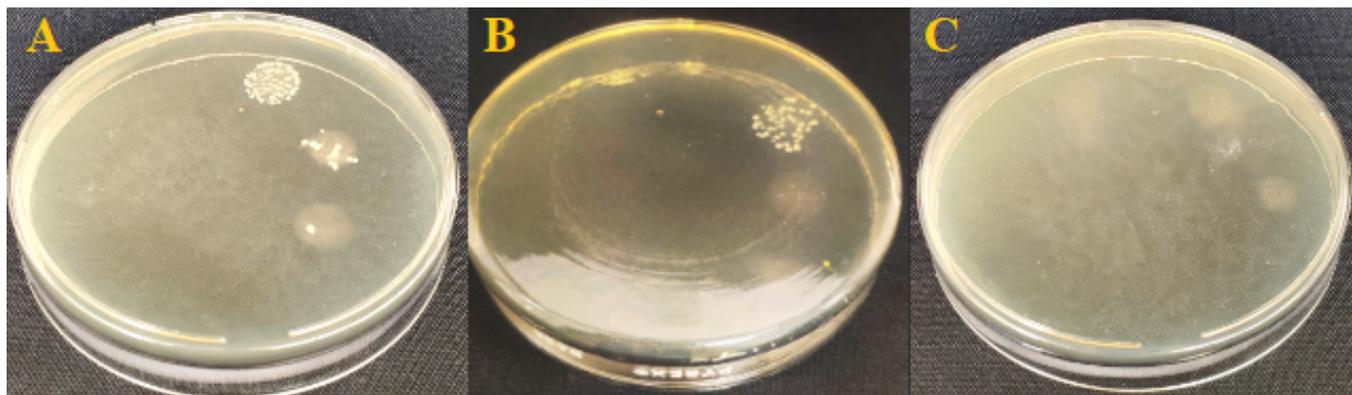


FIGURA 15: Contaminação de 1 dia em terço cervical (A), médio (B) e apical (C), respectivamente.

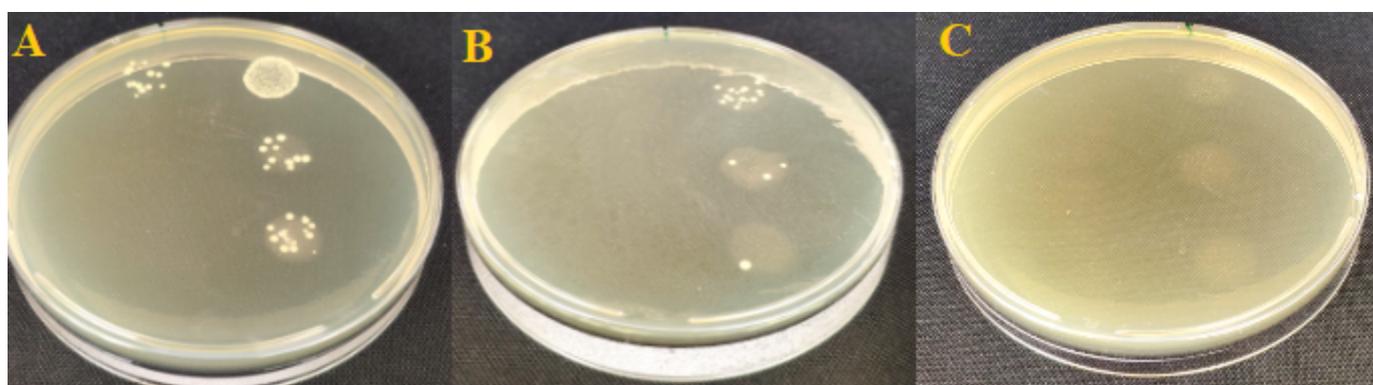


FIGURA 16: Contaminação de 5 dias em terço cervical (A), médio (B) e apical (C), respectivamente.

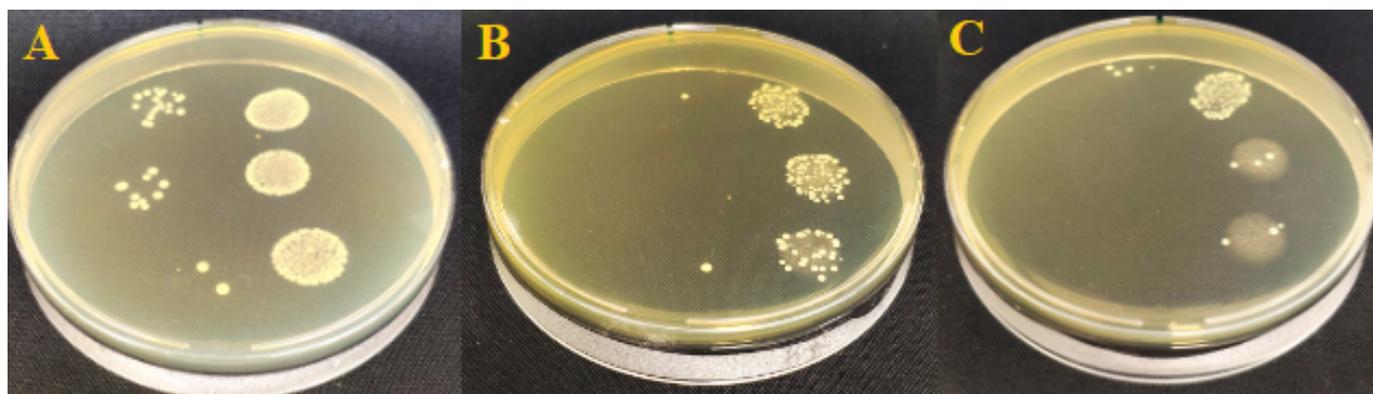


FIGURA 17: Contaminação de 21 dias em terço cervical (A), médio (B) e apical (C), respectivamente.

4.11 Análise em Microscopia Confocal

Com o objetivo de se obter imagens ilustrativas referentes aos 3 métodos de contaminação *in vitro*, 2 amostras extras de cada grupo foram selecionadas randomicamente e fragmentados em 3 blocos de 5 mm cada: apical, médio e cervical com

o auxílio de um cinzel e martelo de borracha. Para cada terço, foram produzidos 3 segmentos axiais radiculares de 1 mm de espessura cada (*slices*), através de secção transversal da raiz. As secções foram obtidas utilizando um disco diamantado de 0,6 mm de espessura (ISOMET 5000; Buehler Ltd, Lake Bluff, IL), em velocidade de 1000 rpm sob constante refrigeração. As superfícies externas dos *slices* foram refinadas com discos de lixa de granulação de gramatura 600, 1000, 1200 e 1500. (adaptado de MA, 2011). A smear layer dos *slices* foi removida por imersão dos blocos em cuba ultrassônica, da mesma forma como descrito em item 4.5. Na sequência, os *slices* foram divididos em 3 grupos de acordo com o protocolo de contaminação conforme descrito em item 4.7. Após o período de incubação, os *slices* foram inseridos individualmente em microplacas, contendo com 30 µL da solução Live/Dead® BacLight Bacterial Viability Kit L7012 (Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregon, EUA). As microplacas foram fechadas e envoltas em papel-alumínio, a fim de proporcionar melhor difusão do corante, sob ausência de luz e em temperatura de 4 °C por 15 min (DAI, S. et al., 2009). Ao final, os *slices* foram imediatamente analisados em microscópio confocal, com aumento de 40X, com resolução 512 x 512, velocidade de 400 Hz e zoom de 4.5X.

5. RESULTADOS

A variável independente *Grupos* foi organizada conforme a seguir:

- G1 = Grupo 1 = Contaminação de 1 dia
- G2 = Grupo 2 = Contaminação de 5 dias
- G3 = Grupo 3 = Contaminação de 21 dias

A variável dependente *Coletas* foi organizada conforme a seguir:

- LÚMEN = Coleta microbiológica do lúmen do canal radicular
- C1 = Coleta microbiológica do terço cervical profundidade 1
- C2 = Coleta microbiológica do terço cervical profundidade 2
- C3 = Coleta microbiológica do terço cervical profundidade 3
- M1 = Coleta microbiológica do terço médio profundidade 1
- M2 = Coleta microbiológica do terço médio profundidade 2
- M3 = Coleta microbiológica do terço médio profundidade 3

A1 = Coleta microbiológica do terço apical profundidade 1

A2 = Coleta microbiológica do terço apical profundidade 2

A3 = Coleta microbiológica do terço apical profundidade 3

Valores médios (Log10) de UFC/ml em cada grupo nas diferentes coletas são apresentados na Tabelas 3, 4 e 5:

GRUPOS	LUMEN	C1	C2	C3	M1	M2	M3	A1	A2	A3
1	5,6990	3,6857	2,3010	,0000	3,4065	2,6021	,0000	,0000	,0000	,0000
1	5,8893	3,6385	2,3010	,0000	,0000	,0000	,0000	,0000	,0000	,0000
1	5,6675	3,6946	2,4771	2,1761	3,3010	2,6990	,0000	,0000	,0000	,0000
1	5,6021	3,5855	2,6990	,0000	,0000	,0000	,0000	1,6990	,0000	,0000
1	5,7033	3,6946	2,6021	2,4771	3,0969	2,1761	,0000	,0000	,0000	,0000
1	5,8603	3,6580	3,1139	2,8751	3,0212	,0000	,0000	,0000	,0000	,0000
1	5,6532	3,8573	3,1761	1,6990	3,3711	,0000	,0000	,0000	,0000	,0000
1	5,6128	3,6857	3,1903	2,9031	3,4065	3,1761	2,0000	,0000	,0000	,0000
1	5,6857	3,6532	2,8129	,0000	2,8751	2,6990	2,3979	,0000	,0000	,0000
1	5,7243	3,8451	3,6484	3,0000	3,0000	,0000	,0000	,0000	1,6990	1,6990
1	5,6902	3,8293	3,5051	2,9777	3,5441	,0000	,0000	2,1761	2,1761	1,6990
1	5,7202	3,8808	3,4771	3,4393	3,4843	,0000	,0000	,0000	,0000	,0000
1	5,9777	3,9542	3,0607	2,6990	3,6532	,0000	,0000	,0000	,0000	,0000
1	5,7202	3,9890	3,3979	3,0212	3,5740	2,1761	,0000	,0000	,0000	,0000
1	5,8603	3,6990	3,6857	2,9294	,0000	,0000	,0000	,0000	,0000	,0000
1	5,7597	3,7033	3,4624	2,6990	,0000	,0000	,0000	,0000	,0000	,0000

TABELA 3: Valores médios (Log10) de UFC/ml do grupo 1 – Contaminação de 1 dia.

GRUPOS	LUMEN	C1	C2	C3	M1	M2	M3	A1	A2	A3
2	5,6990	3,8451	2,4771	2,6990	2,8129	,0000	,0000	,0000	,0000	,0000
2	5,7782	3,9542	3,2430	2,9542	3,0212	,0000	,0000	,0000	,0000	,0000
2	5,9112	3,8751	3,2041	2,6990	2,6990	,0000	,0000	,0000	,0000	,0000
2	5,8513	3,6021	3,1614	2,6532	3,1761	,0000	,0000	,0000	,0000	,0000
2	5,8482	3,6990	3,4065	2,8129	3,0000	,0000	,0000	1,6990	,0000	,0000
2	5,8837	3,6532	3,0000	2,6021	3,1761	3,6990	,0000	2,0000	1,6990	,0000
2	5,6721	3,6532	3,5502	2,5441	3,4393	,0000	,0000	,0000	,0000	,0000
2	5,7118	3,7033	3,1614	2,7404	3,2175	,0000	,0000	,0000	,0000	,0000
2	5,6767	3,6990	3,3802	2,4771	3,3010	2,5441	,0000	,0000	,0000	,0000
2	5,6580	3,8451	3,3222	2,5441	3,4393	3,0000	,0000	,0000	,0000	,0000
2	5,8751	3,6990	3,5441	3,4771	3,4771	2,6990	,0000	2,1761	,0000	2,0000
2	5,7076	3,7597	3,5315	3,3979	3,3010	2,8751	,0000	2,3979	2,3010	,0000
2	5,8293	3,8129	3,4393	3,0969	3,4393	3,0212	2,8751	,0000	,0000	,0000
2	5,8543	3,7482	3,2672	2,8751	3,3222	3,1903	2,0000	2,0000	,0000	,0000
2	5,6021	3,7597	3,3010	3,0000	3,4843	3,0000	1,6990	,0000	,0000	,0000
2	5,6990	3,7782	3,3118	3,0212	3,0607	,0000	,0000	,0000	,0000	,0000

TABELA 4: Valores médios (Log10) de UFC/ml do grupo 2 – Contaminação de 5 dias.

GRUPOS	LUMEN	C1	C2	C3	M1	M2	M3	A1	A2	A3
3	5,7324	3,7782	2,8451	2,6990	3,6284	2,3979	2,5441	1,6990	2,3010	2,3010
3	6,0000	5,3324	3,4065	2,6990	5,0000	3,3979	2,6990	2,6990	2,8751	2,3979
3	5,6385	5,3802	5,0792	5,0000	3,4843	2,1761	,0000	2,6021	1,6990	1,6990
3	5,9890	3,9031	3,8837	3,7782	3,3522	2,1761	,0000	2,6021	1,6990	,0000
3	5,9542	3,9638	3,8663	3,6385	3,4914	3,3010	2,8751	3,2672	,0000	1,6990
3	5,9638	3,7364	3,4771	3,3979	3,6990	3,4843	3,1303	3,0969	2,5441	2,1761
3	5,9469	3,8325	3,0969	2,9294	2,8751	,0000	3,1903	2,6532	,0000	,0000
3	6,1717	3,9614	3,9345	3,8692	3,5740	3,3010	3,0969	3,1761	,0000	,0000
3	7,4314	4,0022	3,4698	3,3324	3,4150	2,0000	1,6990	2,6990	,0000	,0000
3	6,1089	5,7324	5,4843	3,7709	3,9294	3,5855	3,0000	3,1903	2,4771	,0000
3	6,0191	3,7202	3,4065	3,3979	3,5502	2,0000	2,0000	3,3010	,0000	,0000
3	6,0000	3,7482	4,5051	3,3802	3,6180	2,1761	2,3010	3,3010	2,3010	1,6990
3	6,1477	5,9058	5,6021	3,8451	3,6902	3,3979	2,1761	3,1461	2,8129	,0000
3	7,3222	3,7559	3,3802	3,2041	3,5378	3,0212	2,6990	3,2041	2,4771	2,3010
3	7,2304	4,0022	3,9590	3,8779	3,7959	3,5119	2,8751	3,3802	1,6990	1,6990
3	7,4698	3,9004	3,5119	3,2788	3,6180	3,4771	3,1614	3,6021	2,1761	2,1761

TABELA 5: Valores médios (Log10) de UFC/ml do grupo 3 – Contaminação de 21 dias.

Os cálculos foram realizados pelo software SPSS 2 (Statistical Package for Social Services, IBM, Armonk, Nova York, EUA). O grau de significância foi ajustado em $\alpha = 0,05$.

Considerando o valor da amostra para os grupos experimentais de $n = 48$ e que para cada uma das amostras, foi realizada a secção em terços, obteve-se ao total 144 corpos de prova que foram analisados individualmente. Assim, como o valor real de $n > 50$, aplicou-se o teste de Kolmogorov-Smirnov para análise de homogeneidade dos dados totais da amostra. Considerando, respectivamente, as hipóteses nula e alternativa para o teste de homogeneidade, tem-se que:

H_0 = a distribuição de dados da amostra é igual a uma distribuição normal ou paramétrica;

H_1 = a distribuição de dados da amostra não é igual a uma distribuição normal ou paramétrica.

Analisando os dados da tabela dos testes de normalidade, verifica-se que para alguns agrupamentos, o valor de $p < 0,05$, conforme Tabela 6. Desta forma, considera-se que todos os dados não obedeceram a uma distribuição paramétrica. Rejeitou-se a hipótese nula e adotou-se a hipótese alternativa para todos os agrupamentos no teste de distribuição de dados

Assim, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis de Amostras Independentes, para comparação de variáveis independentes não pareadas através de *rank* de postos calculado pelo próprio aplicativo, conforme Tabela 7.

Testes de Normalidade

GRUPOS	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk			
	Estatística	df	Sig.	Estatística	df	Sig.	
LUMEN	1	,244	16	,012	,901	16	,082
	2	,211	16	,056	,912	16	,125
	3	,342	16	,000	,745	16	,001
C1	1	,286	16	,001	,892	16	,059
	2	,149	16	,200*	,970	16	,834
	3	,393	16	,000	,688	16	,000
C2	1	,141	16	,200*	,925	16	,204
	2	,215	16	,047	,824	16	,006
	3	,237	16	,017	,871	16	,028
C3	1	,254	16	,007	,760	16	,001
	2	,145	16	,200*	,920	16	,169
	3	,189	16	,129	,903	16	,091
M1	1	,353	16	,000	,667	16	,000
	2	,148	16	,200*	,916	16	,147
	3	,259	16	,005	,758	16	,001
M2	1	,324	16	,000	,783	16	,002
	2	,293	16	,001	,763	16	,001
	3	,236	16	,017	,802	16	,003
M3	1	,517	16	,000	,410	16	,000
	2	,486	16	,000	,518	16	,000
	3	,205	16	,072	,761	16	,001
A1	1	,517	16	,000	,412	16	,000
	2	,429	16	,000	,636	16	,000
	3	,228	16	,026	,860	16	,019
A2	1	,517	16	,000	,412	16	,000
	2	,516	16	,000	,413	16	,000
	3	,234	16	,020	,800	16	,003
A3	1	,518	16	,000	,398	16	,000
	2	,536	16	,000	,273	16	,000
	3	,296	16	,001	,755	16	,001

TABELA 6: Análise da homogeneidade da distribuição de dados. Se valor sig < 0,05 para um único agrupamento, considera-se distribuição não homogênea de todos os dados da amostra.

Considerou-se para o teste de Kruskal-Wallis, as seguintes hipóteses nula e alternativa:

H_0 = a mediana da variável estudada é igual em todas as populações estudadas;

H_1 = há, pelo menos, uma diferença entre as medianas da variável estudada em todas as populações.

Com base nos resultados apresentados, se $p < 0,05$, rejeita-se a hipótese nula e adota-se a hipótese alternativa para o teste de comparações.

Estadísticas de teste^{a,b}

	LUMEN	C1	C2	C3	M1	M2	M3	A1	A2	A3
H de Kruskal-Wallis	21,468	13,844	12,858	18,866	17,849	11,674	25,511	35,348	16,947	13,158
gl	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Significância Sig.	,000	,001	,002	,000	,000	,003	,000	,000	,000	,001

TABELA 7: Nível de significância entre as variáveis analisadas. Se valor sig. < 0,05, há diferença estatística significativa entre variáveis analisadas.

O resultado do teste de Kruskal-Wallis concluiu que existe diferença estatística significativa nas variáveis apresentadas, entretanto, não fornece a informação de onde está a diferença. Para isto, foi preciso considerar um terceiro teste chamado pos hoc, para que as diferenças se apresentem a partir dos valores de mediana. Aplica-se o Procedimento de Bonferroni (Teste Dunn pos hoc) para comparação aos pares, conforme Tabela 8 e, a partir dos valores de mediana em Tabela 9, é possível apontar onde está a diferença nos grupos estudados.

AMOSTRAS	SIGNIFICÂNCIA AJUSTADA (FATOR DE CORREÇÃO DE BONFERRONI)
L - G1G3	0,000
L - G2G3	0,000
C1 - G1G3	0,002
C1 - G2G3	0,008
C2 - G1G3	0,002
C2 - G2G3	0,030
C3 - G1G3	0,000
C3 - G2G3	0,005
M1 - G1G3	0,001
M1 - G2G3	0,001
M2 - G1G3	0,000
M2 - G2G3	0,000
M3 - G1G3	0,000
M3 - G2G3	0,000
A1 - G1G3	0,000
A1 - G2G3	0,000
A2 - G1G3	0,001
A2 - G2G3	0,001
A3 - G1G3	0,008
A3 - G2G3	0,003

TABELA 8: nível de significância ajustada em comparações por pares. Se valor sig. < 0,05, há diferença estatística significativa entre variáveis analisadas.

MEDIANAS (MD)	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Lúmen	5,71	5,74	6,00
C1	3,69	3,75	3,93
C2	3,14	3,30	3,68
C3	2,69	2,77	3,39
M1	3,19	3,25	3,59
M2	0,00	1,27	3,16
M3	0,00	0,00	2,69
A1	0,00	0,00	3,16
A2	0,00	0,00	1,93
A3	0,00	0,00	1,69

TABELA 9: Valores de mediana para determinar maior ou menor diferença entre os grupos comparados.

O teste de Kruskal-Wallis mostrou que, em relação a contaminação microbiana, há diferença entre os grupos quando o Lúmen [$X^2(2) = 21,468$; $p < 0,000$], terço cervical profundidade 1 [$X^2(2) = 13,844$; $p < 0,001$], terço cervical profundidade 2 [$X^2(2) = 12,858$; $p < 0,002$], terço cervical profundidade 3 [$X^2(2) = 18,866$; $p < 0,000$], terço médio na profundidade 1 [$X^2(2) = 17,849$; $p < 0,000$], terço médio profundidade 2 [$X^2(2) = 11,674$; $p < 0,003$], terço médio profundidade 3 [$X^2(2) = 25,511$; $p < 0,000$] e terço apical nas profundidades 1 [$X^2(2) = 35,348$; $p < 0,000$], 2 [$X^2(2) = 16,947$; $p < 0,000$] e 3 [$X^2(2) = 13,158$; $p < 0,001$] são avaliados.

Nas comparações por pares, as diferenças estatísticas significantes de cada coleta se apresentaram conforme a Tabela 10:

Diferença Estatística	Comparação entre os grupos pelo valor da MEDIANA
L - G1G3	G3>G1: 6,00>5,71
L - G2G3	G3>G2: 6,00>5,74
C1 - G1G3	G3>G1: 3,93>3,69
C1 - G2G3	G3>G2: 3,93>3,75
C2 - G1G3	G3>G1: 3,68>3,14
C2 - G2G3	G3>G2: 3,68>3,30
C3 - G1G3	G3>G1: 3,39>2,69
C3 - G2G3	G3>G2: 3,39>2,77
M1 - G1G3	G3>G1: 3,59>3,19
M1 - G2G3	G3>G2: 3,59>3,25
M2 - G1G3	G3>G1: 3,16>0,00
M2 - G2G3	G3>G2: 3,16>1,27
M3 - G1G3	G3>G1: 2,69>0,00
M3 - G2G3	G3>G2: 2,69>0,00
A1 - G1G3	G3>G1: 3,16>0,00
A1 - G2G3	G3>G2: 3,16>0,00
A2 - G1G3	G3>G1: 1,93>0,00
A2 - G2G3	G3>G2: 1,93>0,00
A3 - G1G3	G3>G1: 1,69>0,00
A3 - G2G3	G3>G2: 1,69>0,00

TABELA 10: Comparação entre os grupos que apresentaram diferença estatística significativa pelos valores de mediana.

Assim, a contagem de UFC no lúmen e nos terços cervical, médio e apical, nas 3 profundidades estudadas (0 – 750 μm , 0 – 900 μm e 0 – 950 μm , respectivamente), foi maior na contaminação de 21 dias.

A contagem de UFC do terço apical nas 3 profundidades (0 – 950 μm) foi menor, se comparada com os terços cervical e médio nas 3 profundidades (0 – 770 μm , 0 – 900 μm , respectivamente), para os 3 métodos de contaminação.

A contaminação de 21 dias apresentou diferença estatística significativa em comparação com a contaminação de 1 e de 5 dias nas coletas do L, C1, C2, C3, M1, M2, M3, A1, A2 e A3. Para todas essas coletas, a contagem de UFC foi maior na contaminação de 21 dias.

Não houve diferença estatística entre os grupos de 1 e 5 dias de contaminação, no lúmen e nos 3 terços, nas 3 profundidades estudadas, apesar dos valores de UFC terem sido maiores na contaminação de 5 dias.

Na análise ilustrativa do confocal, foi possível observar diferenças entre as profundidades de contaminação presentes nos terços de acordo com os protocolos de contaminação avaliados, conforme Figuras 18,19 e 20.

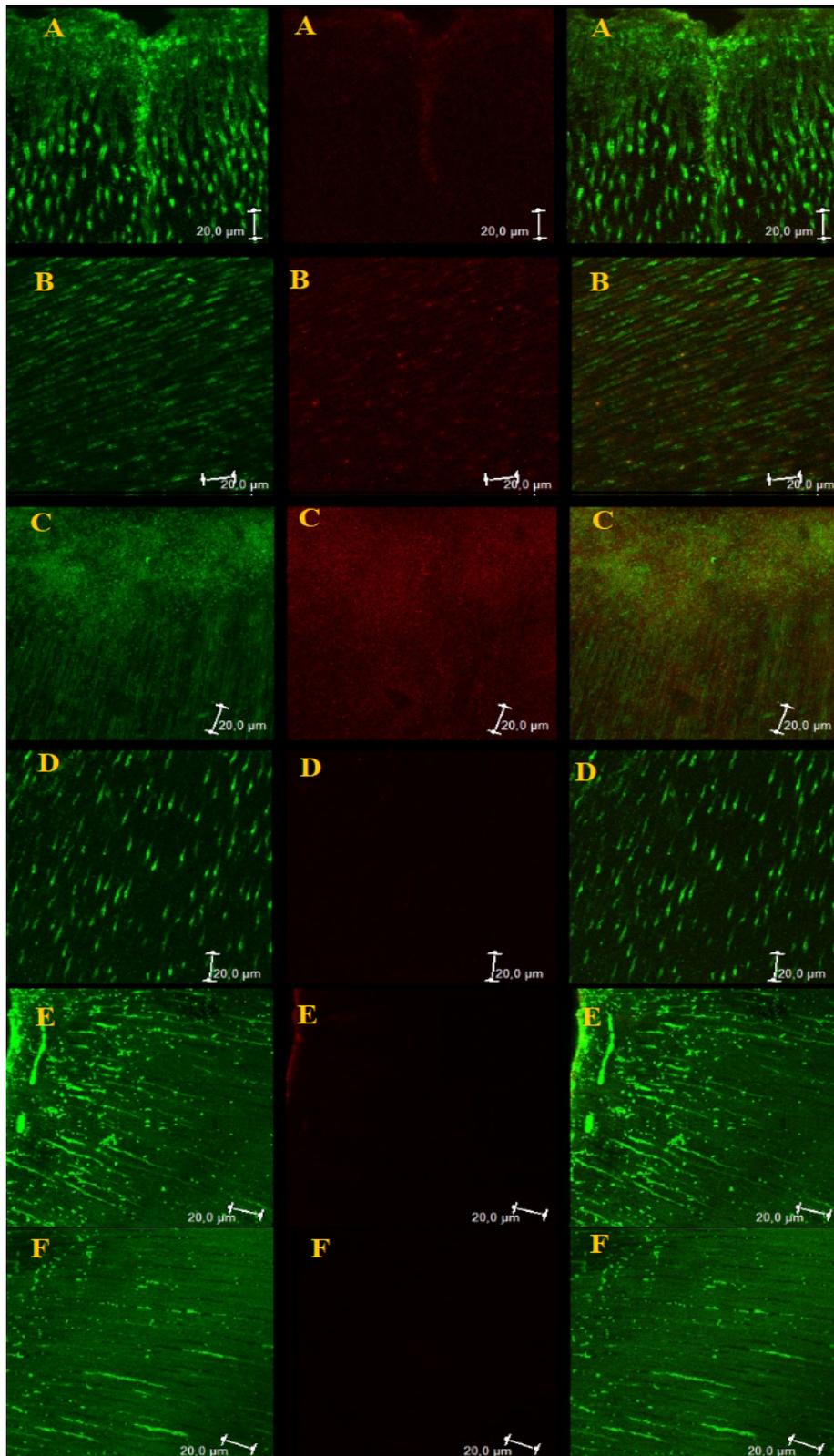


FIGURA 18: Contaminação de 1 dia, em profundidade de 0 - 150 μm a partir do lúmen do canal radicular e de 150 - 300 μm no interior dos túbulos dentinários: A - terço cervical de 0 - 150 μm ; B - terço cervical de 150 - 300 μm ; C - terço médio de 0 - 150 μm ; D - terço médio de 150 - 300 μm ; E - terço apical de 0 - 150 μm ; e F - terço apical de 150 - 300 μm no interior dos túbulos dentinários.

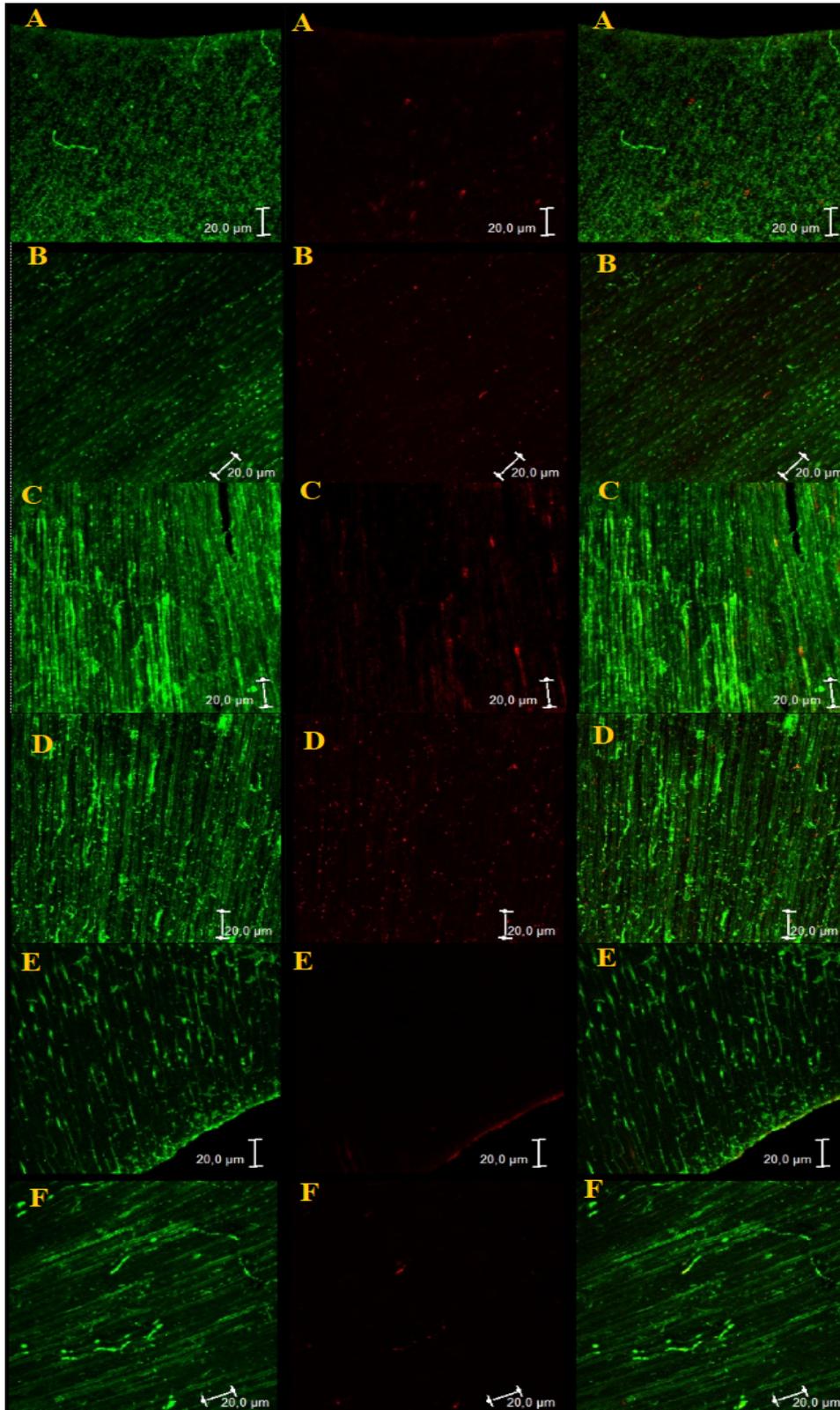


FIGURA 19:
 Contaminação de 5 dias, onde temos profundidade de 0 - 150 μm a partir do lúmen do canal radicular e de 150 - 300 μm no interior dos túbulos dentinários: A - terço cervical de 0 - 150 μm ; B - terço cervical de 150 - 300 μm ; C - terço médio de 0 - 150 μm ; D - terço médio de 150 - 300 μm ; E - terço apical de 0 - 150 μm ; e F - terço apical de 150 - 300 μm no interior dos túbulos dentinários.

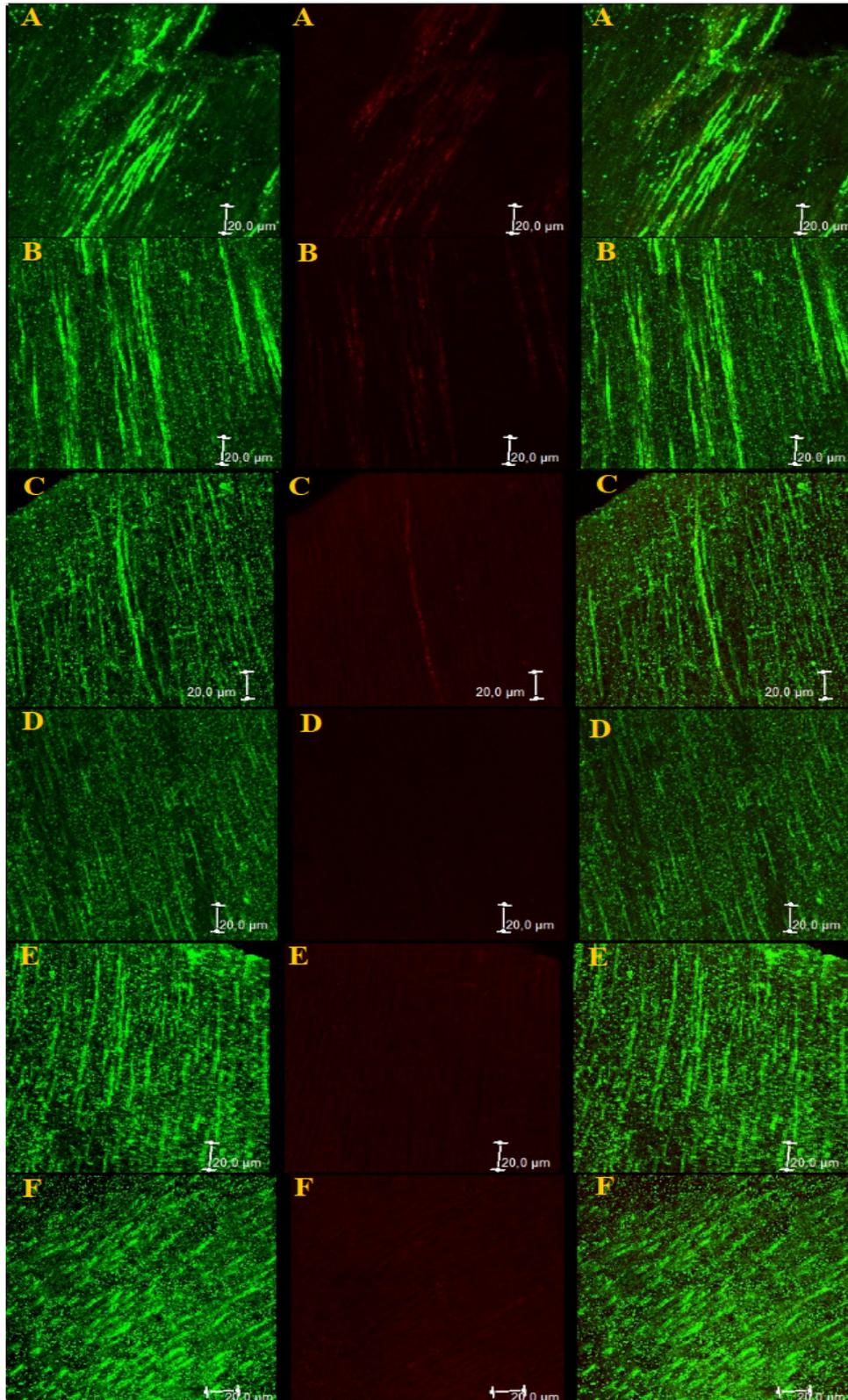


FIGURA 20: Contaminação de 21 dias, onde temos profundidade de 0 - 150 μm a partir do lúmen do canal radicular e de 150 - 300 μm no interior dos túbulos dentinários: A - terço cervical de 0 - 150 μm ; B - terço cervical de 150 - 300 μm ; C - terço médio de 0 - 150 μm ; D - terço médio de 150 - 300 μm ; E - terço apical de 0 - 150 μm ; e F - terço apical de 150 - 300 μm no interior dos túbulos dentinários.

6. DISCUSSÃO

Em todas as coletas de todas as profundidades de cada terço, a contaminação de 21 dias apresentou diferença estatística significativa com relação a contaminação de 1 e 5 dias. Estes resultados estão de acordo com Haapasalo & Orstavick (1987) que concluíram que a média de crescimento bacteriano dentro dos túbulos dentinários aumentava lentamente considerando o fator tempo, ou seja, quanto maior for o tempo de contaminação, maior será a quantidade de bactérias e maior será a profundidade de penetração da contaminação no interior dos túbulos dentinários.

Na contaminação de 1 e de 5 dias, UFC's foram detectadas em quantidades semelhantes no lúmen e em todas as profundidades do terço cervical (0 – 750 μm), do terço médio (0 – 900 μm) e do apical (0 – 950 μm). A partir da profundidade 3 do terço médio (700 – 900 μm) e em todo o terço apical (0 – 950 μm), a quantidade de UFC foi insignificante para ambos os protocolos. Isso pode ser explicado pela quantidade reduzida de túbulos dentinários em terço apical, além da esclerose dentinária causada pelo envelhecimento (CARRIGAN et al., 1984; PAQUE et al., 2006). Com a idade, a dentina peritubular torna-se mais mineralizada, com redução de tamanho do diâmetro e número dos túbulos (TRONSTAD, 1973; CARRIGAN et al, 1984; PAQUE et al., 2006). A média do número de túbulos em qualquer idade, nos terços cervical e médio é similar. Entretanto, a quantidade de túbulos dentinário no terço apical é consideravelmente menor. Variações morfológicas dos túbulos dentinários determinam o padrão de penetração bacteriana e portanto, o padrão de contaminação. É importante considerar a concentração do gradiente do inóculo. Existe alto gradiente inicial entre inóculo e meio. O conteúdo dos fluídos se equilibram inicialmente por difusão em lúmen e a concentração de inóculo que alcança o interior dos túbulos dentinários é menor, limitando o crescimento bacteriano intratubular quando este é passivo. A taxa de difusão varia com relação a área. Se o diâmetro do túbulo dentinário próximo à câmara pulpar é de 2,5 μm e reduz para 0,9 μm próximo à periferia (GARBEROGLIO & BRANNSTRÖM, 1976), isso representa 64% de redução do raio do túbulo e 87% de redução de área de superfície. Logicamente, se a taxa de difusão é diretamente proporcional à área, quando há diminuição desta, há diminuição também da taxa de difusão. Assim, a contaminação dos túbulos dentinários é dependente da taxa de difusão, do gradiente de concentração e área de superfície (LOVE, 1996). Ma et al. (2011) e Andrade et al, (2015) apresentaram sequências de

renovação de inóculo e meio nutritivo em ciclos de centrifugação. Os túbulos dentinários partem da margem dentina-polpa em direção à junção cimento-esmalte em linha reta na porção radicular (JUD et al., 2016). Entretanto, apesar do ângulo de orientação dos túbulos variar pouco ao longo da raiz, a quantidade e diâmetro dos túbulos dentinários são menores em direção ao terço apical (JUD et al., 2016), não permitindo a penetração de todo conteúdo do lúmen para o interior dos túbulos de forma regular e homogênea. Outro fator a ser considerado é a presença de bolhas de ar conhecidas como *vapor lock* presentes lúmen e no interior dos túbulos dentinários que podem impedir a penetração de inóculo e meio nutritivo. A presença de bolhas de ar no interior do canal radicular já foi relatada em estudos prévios (DE GREGORIO et al., 2009; TAY et al., 2010; VERA et al., 2012). Assim, as características morfológicas da dentina, somadas à presença de bolhas de ar no sistema de canais radiculares podem explicar os resultados tanto em quantidade de bactérias quanto em profundidade de penetração nas contaminações de 1 e de 5 dias.

O protocolo de 5 dias preconiza a agitação ultrassônica do BHI caldo, previamente às contaminações. Sob a justificativa de preencher o máximo possível o interior dos túbulos dentinários com meio nutritivo, a agitação poderia reduzir o vapor lock formado. Entretanto, o espécime representava um sistema de canais radiculares fechado e a formação e confinamento de bolhas de ar dentro do lúmen e túbulos dentinários pode ser reduzido, mas não eliminado. Para Boutsoukis et al., (2014), uso de uma agulha de irrigação com abertura em extremidade final, disposta o mais próximo possível do comprimento do dente, fluxo forte e sem movimentação, pode minimizar a formação de bolhas de ar no interior do conduto. Entretanto, isso não foi observado em nosso estudo, visto que nenhuma agulha foi utilizada para preencher o interior do canal com meio durante os processos de contaminação estudados. A contaminação de 21 dias ocorre pelo crescimento das células bacterianas em meio nutritivo. A divisão celular ocorre se há nutrição proporcionada pela penetração do meio nutritivo no interior dos túbulos dentinários. (PEREZ et al., 1993a; SIQUEIRA JR et al., 1996). O crescimento bacteriano dependente do fator tempo parece vencer a barreira de vapor lock. Ao formar biofilme, as trocas metabólicas entre os microrganismos satisfazem a necessidade dos mesmos em ambiente inóspito. Em 21 dias de contaminação, a dinâmica de crescimento bacteriano pareceu ser mais dependente do biofilme em formação que da presença de meio nutritivo em profundidade nos túbulos (BOURGEAU & MCBRIDE, 1976; PEREZ et al., 1993a). Os resultados estão de acordo com estudo prévio (PEREZ et al., 1993ab), considerando que o crescimento celular ativo, lento, sem formação de geometria de obstáculo pode ser mais

importante que a presença de meio nutritivo em si, que não penetra totalmente para o interior dos túbulos dentinários, nem ao ser renovado durante os protocolos *in vitro*. A estrutura do biofilme é capaz de incorporar grandes quantidades de água e formar canais que permitem o fluxo de moléculas (KARATAN & WATNICK, 2009), facilitando a penetração de meio nutritivo através de canais de trocas metabólicas entre os microorganismos do biofilme formado (BOURGEAU & MCBRIDE, 1976; PEREZ et al., 1993a). Os resultados estão de acordo com Zapata et al, (2008) que afirmaram que a invasão dentinária pelo *E. faecalis* é um processo ativo mediado pela divisão celular da própria bactéria. A forma de contaminação ativa explicaria a maior quantidade de UFC's em todas as profundidades de todos os terços na contaminação de 21 dias.

E faecalis é resistente, suportando os períodos de centrifugação (MA et al., 2011). Salientamos que o período mínimo de incubação de 24 horas após a sequência de centrifugações no protocolo de contaminação de 1 dia permite à bactéria a recuperação de qualquer estresse ao qual foi submetida. O tamanho e o formato celular favorecem a penetração para o interior dos túbulos dentinários. Por serem células esféricas pequenas, são facilmente empurradas para o interior do sistema de canais radiculares. O diâmetro dos túbulos dentinários varia, na direção polpa – cimento, de 2,5 μm a 0,9 μm (GARBEROGLIO & BRANNSTROM, 1976) e o diâmetro da espécie *Enterococcus faecalis* é de aproximadamente 1/3 dos túbulos. Assim, a centrifugação prevista nas etapas de contaminação de 1 e de 5 dias poderia ejetar uma grande quantidade de bactérias para o interior dos túbulos dentinários a partir do lúmen. Entretanto, devido à morfologia e distribuição dos túbulos dentinários ao longo dos terços (JUD et al., 2016) e a presença de vapor lock, isso não acontece. Nossos resultados provenientes da contaminação de 5 dias também podem ser parcialmente explicados pela agitação prévia em vórtex nos 5 dias de renovação de inóculo. Após 24 horas de incubação, a força de adesão ao colágeno tipo 1 da dentina não é forte e madura o suficiente e é possível que a agitação tenha sonificado o biofilme recém-formado ao romper as interações intermoleculares além da ligação ao colágeno tipo 1 da dentina, liberando as bactérias para o meio que será renovado. Os estudos de Love (1996, 2001) relacionam sinergia de ligação entre *E faecalis* ao colágeno tipo 1 dos túbulos dentinários. Após período de contaminação de 14 dias, com a adição de sêrum humano ao meio, houve um aumento da quantidade de células bacterianas que se ligaram ao colágeno fixo da dentina, promovendo maior força de adesão e permitindo crescimento celular ativo para o interior do túbulo. Convém citar

que o sistema de esterilização das amostras por autoclave por 20 minutos a 121°C não degrada a estrutura da matriz de colágeno tipo 1 da dentina (PARSELL et al., 1998).

Os modelos de contaminação *in vitro* utilizados neste estudo, baseados em Haapasalo & Orstavik (1987), Ma et al. (2011) e Andrade et al. (2015) tiveram algumas modificações. Pré-molares inferiores humanos foram utilizados ao invés de dentes bovinos. As vantagens em se utilizar dentes humanos são a manutenção da geometria e morfologia do sistema de canais radiculares além da simulação de uma condição clínica mais padronizada (DE MEYER et al., 2017; SWIMBERGHE et al., 2019a). Estudos que investigaram penetração bacteriana intratubular utilizando dentes bovinos, trabalharam com diâmetro de túbulos entre 4 a 7 µm (HAAPASALO & ORSTAVIK, 1987; PEREZ et al., 1993b; SIQUEIRA JR et al., 1996; ZAPATA, 2008), o que leva a uma maior contaminação, tanto em quantidade quanto profundidade (BERKITEN et al., 2000) pelas diferentes taxas de difusão e velocidade de crescimento bacteriano (CARRIGAN et al., 1984).

Em nosso estudo, a camada de cimento da amostra não foi removida, como sugerem muitos autores (AKPATA & BLECHMAN, 1982; HAAPSALO & ORSTAVIK, 1987; PEREZ et al., 1993ab; SIQUEIRA JR et al., 1996; LOVE, 1996; MA et al., 2011; PARMAR et al., 2011). Mantendo um sistema de canais radiculares aberto, é sabido que o grau de penetração de meio e inóculo no interior de túbulos dentinários é maior (HAAPSALO & ORSTAVIK, 1987; AKPATA & BLECHMAN, 1982; LOVE, 1996) e a contaminação dos túbulos que ocorre por difusão de fluidos devido às diferenças de concentração é maior. Em função desta maior difusão de meio e inóculo por forças de capilaridade, há chances de superdimensionar o estudo (LOVE 1996). A contaminação retrógrada via túbulos dentinários para tecido pulpar é irregular, não é passível de padronizações e não reproduz infecções endodônticas exclusivas *in vivo* (Alyahya & Alqareer, 2017). Assim, consideramos que este estado não é fidedigno à forma de contaminação endodôntica *in vivo* e não permite estudar o padrão de contaminação intratubular pelo crescimento bacteriano ativo (LOVE, 1996). Existem evidências de que a contaminação dos túbulos é um processo ativo mediado pela divisão celular da própria bactéria (ZAPATA et al, 2008). Em nosso trabalho, a camada externa radicular foi coberta com duas camadas de verniz de unha e o forame apical foi selado em resina composta, simulando um sistema de canais radiculares fechados. Isso nos fornece a padronização da contaminação *in vitro* exclusivamente a partir do crescimento celular do lúmen para o interior de túbulos

dentinários, excluindo qualquer possibilidade de contaminação retrógrada via apical, tampouco via túbulos dentinários pela superfície radicular externa por difusão.

As amostras microbiológicas foram coletadas do interior do lúmen do canal radicular através de cone de papel absorvente estéril (bactérias planctônicas) e do interior dos túbulos dentinários através de debris produzidos pelo uso de brocas (bactérias aderidas a dentina). O método de cultura foi aplicado permitindo a determinação no número de unidades formadoras de colônias de cada amostra, caracterizando uma medida de resultado deste estudo. Contagem de unidades formadoras de colônia é frequentemente aplicada e universalmente aceita como método de comparação de diferentes modalidades de desinfecção do canal radicular *in vitro* (SWIMBERGHE et al., 2019b) Os cones de papel utilizados eram de tamanho compatível com o último instrumento do preparo do canal radicular (Reciproc R25). Desta forma, o cone de papel adaptou-se perfeitamente às paredes do canal radicular, fidelizando a coleta. A maioria dos estudos avaliam a contaminação do canal radicular recolhendo amostras com o uso do cone de papel absorvente. A limitação desta técnica é que a amostra bacteriana recolhida é somente do lúmen do canal radicular (ASNAASHARI et al., 2017). Assim, neste trabalho, foram coletadas, sequencialmente, raspas dentinárias através de brocas diamantadas em baixa rotação, com o objetivo de isolar bactérias que estão alojadas no interior dos túbulos dentinários e avaliar contaminação em profundidade de túbulos. Amostras de raspas de dentina foram coletadas através do uso de brocas 3069 (ISO 018), 3139 (ISO 021) e 4137 (ISO 025) (KGSorensen, São Paulo, São Paulo, Brasil) e as medidas de penetração de cada broca, em cada terço, são aproximadas, considerando o formato cônico do canal radicular, padronizado com instrumento Reciproc R25. Essa metodologia é utilizada em estudos de avaliação de difusão de substâncias antimicrobianas pelo interior dos túbulos dentinários, com uso de brocas (ORSTAVIK & HAAPSALO; 1990; ALMYROUDI et al., 2002; GOMES et al., 2003; VIVACQUA-GOMES et al., 2005; BERBER et al., 2006) e limas endodônticas (AFKHAMI et al., 2020, 2021).

Neste estudo, optou-se pela técnica de cultura por ser possível detectar somente bactérias viáveis. Técnicas moleculares como as sondas de DNA reconhecem e hibridizam com a sequência-alvo, que pode ser espécie específica ou gênero específica. A hibridização de sonda à sequência-alvo é visualizada através de eletroforese pela ligação com brometo de etídio (SINGH, 1997). Para aumentar a sensibilidade de detecção, a sequência-alvo precisa estar presente em múltiplas cópias, que podem ser de DNA ou RNA. Devido à existência de maior número de cópias de RNA na célula, a

sensibilidade de detecção é maior quando a sequência alvo consiste em RNA (SINGH, 1997), particularmente RNA ribossomal, que representa aproximadamente 80% do total de RNAs de uma célula (SINGH, 1997). Entretanto, técnicas moleculares de sequenciamento podem superestimar resultados por detectarem DNA de células viáveis e resíduos de células bacterianas mortas, que também contêm DNA, gerando resultado falso positivo para determinada espécie (TENNERT et al., 2015). Exames de PCR não conseguem distinguir DNA de células viáveis e não viáveis por terem alta sensibilidade e especificidade (YOUNG et al., 2007; COOK et al., 2007; GOMES et al., 2008; SASSONE et al., 2008; SCHIRRMEISTER et al., 2008; TENNERT et al., 2015). Neste contexto, a presença de DNA no sistema de canais radiculares deve ser avaliada com parcimônia. Há necessidade de associar técnicas de cultura para poder quantificar e qualificar os micro-organismos viáveis causadores da infecção endodôntica (SCHIRRMEISTER et al., 2008; TENNERT et al., 2015). Nos casos em que micro-organismos formam biofilme, o DNA extracelular presente na matriz extracelular também pode ser detectado pelo exame (FLEMMING & WINGENDER, 2010), superestimando resultados.

7. CONCLUSÃO

A metodologia de contaminação *in vitro* de 21 dias permitiu maior quantidade de células bacterianas no lúmen do canal radicular e nos túbulos dentinários, nos 3 terços estudados e em todas as profundidades avaliadas, quando comparada à contaminação de 1 e de 5 dias.

Conclui-se que o protocolo de contaminação passiva de 21 dias é superior aos protocolos de contaminação ativos de 1 e de 5 dias, por vencer as barreiras da anatomia e do vapor lock em um sistema de canais radiculares fechados.

As condições deste trabalho *in vitro* ainda não refletem completamente a condição clínica. Neste estudo, foram utilizados somente dentes pré-molares inferiores com canal central único. Dentes com um sistema de canais radiculares mais complexos podem apresentar diferentes resultados. A presença de um biofilme multiespécie também pode apresentar diferentes resultados pela dinâmica de interação entre os micro-organismos, bem como a manutenção de um sistema de canais radiculares aberto pode influenciar os resultados.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFKHAMI, F.; KARIMI, M.; BAHADOR, A.; AHMADI P.; POURHAJIBAGHER, M.; CHINIFORUSH, N. Evaluation of antimicrobial photodynamic therapy with toluidine blue against *Enterococcus faecalis*: laser vs LED. *Photodiagnosis Photodyn Ther.*, v. 32, p. 1020-36, 2020.
- AFKHAMI, F.; AHMADI, P.; CHINIFORUSH, N; SOORATGAR,A. Effect of different activations of silver nanoparticle irrigants on the elimination of *Enterococcus faecalis*. *Clin Oral Invest.*, v. 25, p. 6893-6899, 2021.
- AKPATA, E. S.; BLECHMAN, H. Bacterial invasion of pulpal dentin wall *in vitro*. *J Dent Res.*, v. 61, p.435-8, 1982.
- ALYAHYA, A.; ALQAREER, A. Does the removal of cementum facilitate bacterial penetration into dentinal tubules *in vitro*? *J Endod.*, v. 43, p. 1111-1115, 2017.
- ALMYROUDI, A.; MACKENZIE, D.; MCHUGH, S.; SAUNDERS, W. P. The effectiveness of various disinfectants used as endodontic intracanal medications: an *in vitro* study. *J Endod.*, v. 28, n. 3, 2002.
- ANDRADE, F. B.; ARIAS, M. P. C.; MALIZA, A. G. A.; DUARTE, M. A. H.; GRAEFF, M. S. C.; AMOROSO-SILVA, P. A.; MIDENA, R. Z.; MORAES, I. G. A new improved protocol for *in vitro* intratubular dentinal bacterial contamination for antimicrobial endodontic tests: standardization and validation by confocal laser scanning microscopy. *J Applied Oral Sci.*, v. 23, n. 6, p.591-598, 2015
- ASNAASHARI, M.; ASHRAF, H.; RAHMATI, A.; AMINI, N. A comparison between effect of photodynamic therapy by LED and calcium hydroxide therapy for root canal disinfection against *Enterococcus faecalis*: a randomized controlled trial. *Photodiagnosis Photodyn Ther.*, v. 17, p. 226-32, 2017.
- BANKOFF, S. B. Entrapment of gas in the spreading of a liquid over a rough surface. *American Institute of Chemical Engineers Journal*, v. 4, p. 24–6, 1958.
- BELLO, Y. D.; MEZZALIRA, G. I.; JAGUSZEWSKI, L, A. Effectiveness of calcium and sodium hypochlorite in association with reciprocating instrumentation on decontamination of root canals infected with *Enterococcus faecalis*. *Aust Endod J.*, v. 45, p.92-97, 2018.
- BERBER, V. B.; GOMES, B. P. F.A.; SENA, N. T.; VIANNA, M. E.; FERRAZ, C. C. R.; ZAIA, A. A.; SOUZA-FILHO, F. J. Efficacy of various concentrations of NaOCl and instrumentation techniques in reducing *Enterococcus faecalis* within root canals and dentinal tubules. *Int Endod J.*, v. 39, p. 10-7, 2006.
- BERKITEN, M.; OKAR, I.; BERKITEN, R. *In Vitro* study of the penetration of streptococcus sanguis and prevotella intermedia strains into human dentinal tubules. *J Endod.*, v. 26, p. 236-9, 2000.
- BICEGO-PEREIRA, E. C.; BARBOSA-RIBEIRO, M.; DE-JESUS-SOARES, A. et al. Evaluation of the presence of microorganisms from root canal of teeth submitted to retreatment due to prosthetic reasons and without evidence of apical periodontitis. *Clin Oral Invest.*, v. 24, p. 3243-54, 2020.
- BOURGEAU, G.; MCBRIDE, B. C. Dextran-mediated interbacterial aggregation between dextran-synthesizing streptococci and *Actinomyces viscosus*. *Infect Immun.*, v.13, p. 1228-34, 1976.
- BOUTSIOUKIS, C.; KASTRINAKIS, E.; LAMBRIANIDIS, T.; VERHAAGEN, B.; VERSLUIS, M.; VAN DER SLUIS, L. W. M. Formation and removal of apical vapor lock during syringe irrigation: a combined experimental and Computational Fluid Dynamics approach. *Inter Endod J.*, v. 47, p. 91–201, 2014.

BYSTROM, A.; SUNVQVIST, G. The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. *Int Endod J.*; v. 18, p. 35–40, 1985a.

BYSTROM, A.; CLAEISSON, R.; SUNDQVIST, G. The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. *Endod Dent Traumatol.*, v. 1, p. 170–5, 1985b.

CARRIGAN, P. J.; MORSE, D. R.; FURST, M. L.; SINAI, I. H. A scanning electron microscope evaluation of human dentinal tubules according to age and location. *J Endod.*, v. 10, p. 359–63, 1984.

CAVALLERI, G.; CUZZOLIN, L.; URBANI, G.; BENONI, G. Root canal microflora: qualitative changes after endodontic instrumentation. *J Chemotherapy.*, v.1, p. 101–2, 1989.

CHAVEZ DE PAZ, L.E.; BERGENHOLTZ, G.; SVENSATER, G. The effects of antimicrobials on endodontic biofilm bacteria. *J. Endod.*, v. 36, p. 70–77, 2010.

CHIVATXARANUKUL, P.; DASHPAR, S. G.; MESSER, H. H. Dentinal tubule invasion and adherence by *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J.*, v. 41, p. 873–882, 2008.

COOK, J.; NANDAKUMAR, R.; FOUAD, A. F. Molecular and culture-based comparison of the effects of antimicrobial agents on bacterial survival in infected dentinal tubules. *J Endod.*, v. 33, p. 690–2, 2007.

DAMETTO, F. R.; FERRAZ, C. C. R.; GOMES, B. P. F. A.; ZAIA, A. A.; TEIXEIRA, F. B.; SOUZA-FILHO, F. J. *In vitro* assessment of the immediate and prolonged antimicrobial action of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant against *Enterococcus faecalis*. *Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol, Oral Radiol and Endod.*, v. 99, p. 768–72, 2005.

DAI, T.; HUANG, Y. Y.; HAMBLIN, M. R. Photodynamic therapy for localized infections—state of the art. *Photodiag Photodyn Therapy*, v. 6, p.170–88, 2009.

DAS, T. Focus on Bacterial Biofilms. IntechOpen, 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.96843>

DE MEYER, S.; MEIRE, M. A.; COENYE, T.; DE MOOR, R.J. Effect of laser-activated irrigation on biofilms in artificial root canals. *Inter Endod J.*, v. 50, p. 472–479, 2017.

DE GREGORIO, C.; ESTEVEZ, R.; CISNEROS, R.; HEILBORN, C.; COHENCA N. Effect of EDTA, sonic, and ultrasonic activation on the penetration of sodium hypochlorite into simulated lateral canals: an *in vitro* study. *J Endod.*, v. 35, p. 891–5, 2009.

DEUTSCH, S. A preliminary study of the fluid mechanics of liquid penetrant testing. *Journal of Research of the National Bureau of Standards*, v. 84, p. 287–92, 1979.

DOVGYALLO, G. I.; MIGUN, N. P.; PROKHORENKO, P. P. The complete filling of dead-end conical capillaries with liquid. *Journal of Engineering Physics*, v. 56, p. 395–7, 1989.

DYKSTRA, M. J. Biological electron microscopy. Theory, techniques, and troubleshooting. New York: Plenum Press, p. 5–78, 1992.

ENGSTROM, B. The significance of enterococci in root canal treatment. *Odontologisk Revy*, v. 15, p. 87–106, 1964.

ERIKSEN, H. M. Epidemiology of apical periodontitis. In: Orstavik, D. & Pitt Ford, T. (Eds.) *Essential endodontology*, 2nd edition. Oxford, UK: Blackwell Science, p. 262–274, 2008.

FABRICIUS, L.; DAHLÉN, G.; HOLM, S. E.; MÖLLER, Å. J. R. Influence of combinations of oral bacteria on periapical tissues of non-keys. *Scandinavian J Dental Research.*, v. 90, p. 200–6, 1982.

- FAZIO, R.; IACONO, S. Entrapped gas action for onedimensional models of capillary dynamics. International Association of Engineers: Kwun Tong, Hong Kong, p. 1016–21, 2009.
- FERRAZ, C. C.R.; GOMES, B. P. F. A.; ZAIA, A. A. ET AL. *In vitro* assessment of the antimicrobial action and the mechanical ability of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant. J Endod., v. 27, p. 452-5, 2001.
- FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. Nat Rev Microbiol., v. 8, p. 623-633, 2010.
- FORSSELL-AHLBERG, K.; BRANNSTROM, M.; EDWALL, L. The diameter and number of dentinal tubules in rat. cat. dog and monkey Acta Odontol Scand., v. 33, p. 243-50, 1975.
- GARBEROGLIO, R.; BRANNSTRÖM, M. Scanning electron microscopic investigation of human dentinal tubules. Arch Oral Biol., v. 21, p. 355-362, 1976.
- GOLOB, B. S.; OLIVI, G.; VRABEC, M.; EL FEGHALI, R.; PARKER, S.; BENEDICENTI, S. Efficacy of photon-induced photoacoustic streaming in the reduction of nterococcus faecalis within the root canal: different settings and different sodium hypochlorite concentrations. J Endod., v. 43, p. 173-85. 2017.
- GOMES, B. P. F. A.; DRUCKER, D. B.; LILLEY, J. D. Association of specific bacteria with some endodontic signs and symptoms. Inter Endod J., v. 27, p. 291-8, 1994^a.
- GOMES, B. P. F. A.; DRUCKER, D. B.; LILLEY, J. D. Positive and negative associations in dental root canals. Microb., v. 80, p. 231-43, 1994^b.
- GOMES, B. P. F. A.; LILLEY, J. D.; DRUCKER, D. B. Clínicl significance of dental root canal microflora. J Dent., v. 29, p. 47-5, 1996a.
- GOMES, B. P. F. A.; SOUZA, F. C.; FERRAZ, C. C. R.; VIANNA, M. E.; BERBER, V. B.; TEIXEIRA, F. B.; SOUZA-FILHO, F.J. *In vitro* antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of Enterococcus faecalis. Inter Endod J., v. 34, p. 424-428, 2001.
- GOMES, B. P. F. A.; SOUZA, F. C.; FERRAZ, C. C. R.; TEIXEIRA, F. B.; ZAIA, A. A.; VALDRIGHI, L.; SOUZA-FILHO, F.J. Effectiveness of 2% chlorexidine gel and calcium hidroxiide against Enterococcus faecalis in bovine root dentine *in vitro*. Int Endod J., v. 36, p. 267-275, 2003.
- GOMES, B. P. F. A.; PINHEIRO, E. T.; GADE-NETO C. R. et al. Microbiological examination of infected dental root canals. Oral Microbiol Immunol., v. 19, p. 71-76, 2004.
- GOMES, B. P. F. A.; JACINTO, R. C.; PINHEIRO, E. T. et al. Molecular analysis of Filifactor alocis, Tannerella forsythia, and Treponema denticola associated with primary endodontic infections and failed endodontic treatment. J Endod., v. 32, n. 10, p. 937–940, 2006.
- GOMES, B. P.; PINHEIRO, E. T.; JACINTO, R. C.; ZAIA, A. A.; FERRAZ, C. C.; SOUZA-FILHO, F. J. Microbial analysis of canals of root-filled teeth with periapical lesions using polymerase chain reaction. J Endod., v. 34, p. 537– 40, 2008.
- GUTIERREZ, J. H.; VILLENA, F.; JOFRE, A.; AM, M. Bacterial infiltration of dentin as influenced by proprietary chelating agents J Endod., v. 8, p.448-54, 1982.
- HANCOCK, H.H.; SIGURDSSON, A.; TROPE, M.; MOISEWITSCH, J. Bacteria isolated after unsuccessful endodontic treatment in a North American population. Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol., v. 91, p. 579–586, 2001.
- HAAPASALO, M.; ØRSTAVIK, D. *In vitro* infection and disinfection of dentinal tubules. J Dent Res., v. 66, p. 1375-1379, 1987.
- HAUPT, F.; SEIDEL, M.; RIZK et al. Diameter and taper variability of single-file instrumentation systems and their corresponding gutta-percha cones. J Endod., v. 44, p. 1436–1441, 2018.

- HORIBA, N.; MACKAWA, Y.; MATSUMOTO, T.; NAKAMURA, H. A study of distribution of endotoxin in the dentinal wall of infected root canals. *J Endod.*, v. 16, p. 331–4, 1990.
- JUD, C.; SCHAFF, F.; ZANETTE, I. et al. Dentinal tubules revealed with X-ray tensor tomography. *Dent Mat.*, v. 32, p. 1189-1195, 2016.
- KAKOLI, P.; NANDAKUMAR, R.; ROMBERG, E. et al. The effect of age on bacterial penetration of radicular dentin. *J Endod.*, v. 35, p. 78-81, 2009.
- KAYAOGLU, G.; ØRSTARVIK D. Virulence Factors of *Enterococcus faecalis*: Relationship to Endodontic Disease. *Crit Rev Oral Biol Med.*, v. 15, p 308-320, 2004.
- KARATAN, E.; WATNICK, P. Signals , Regulatory Networks , and Materials That Build and Break Bacterial Biofilms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 73, n. 2, p. 310–347, 2009.
- KURUVILLA, J. R.; KAMATH, M. P. Antimicrobial activity of 2.5% sodium hypochlorite and 0.2% chlorhexidine gluconate separately and combined, as endodontic irrigants. *J Endod.*, v. 24, p. 472–6, 1998.
- LEE, M. T.; BIRD, P.S.; WALSH, L. J. (2004) Photo-activated disinfection of the root canal: a new role for lasers in endodontics. *Australian Endodontic Journal*, v. 30, p. 93-8, 2004.
- LIU, H.; WEI, X.; LING, J.; WANG, W.; HUANG, X. Biofilm formation capability of *Enterococcus faecalis* cells in starvation phase and its susceptibility to sodium hypochlorite. *J Endod*, v. 36, p. 630-5, 2010.
- LOVE, M. R. Regional variation in root dentinal tubule infection by *Streptococcus gordonii*. *J Endod.*, v. 22, p. 290–3, 1996.
- LOVE, R. M.; MCMILLAN, M. D.; JENKINSON, H. F. Invasion of dentinal tubules by oral streptococci is associated with collagen recognition mediated by the antigen I/II family of polypeptides. *Infection and Immunity*, v. 65, p. 5157–64, 1997.
- LOVE, R. *Enterococcus faecalis*—a mechanism for its role in endodontic failure. *Int Endod J.*, v. 34, p. 399–405, 2001.
- MA, J.; WANG, Z.; SHEN, Y.; HAAPASALO, M. A new noninvasive model to study the effectiveness of dentin disinfection by using confocal laser scanning microscopy. *J Endod.*, v. 37, p. 1380-5, 2011.
- MADSEN, J.S.; RØDER, H.L.; RUSSEL, J.; SØRENSEN, H.; BURMØLLE, M.; SØRENSEN, S.J. Coexistence facilitates interspecific biofilm formation in complex microbial communities. *Environmental Microbiol*, v. 18, p. 2565– 2574, 2016.
- MARINHO, A. C. S.; MARTINHO, F. C.; GONÇALVES, L. M.; RABANG, H, R.C.; GOMES, B. P. F. A. Does the Reciproc file remove root canal bacteria and endotoxins as effectively as multifile rotary systems? *Int Endod J.*, v. 48, p. 542-8, 2015.
- MARSHALL, G. W. JR.; MARSHALL, S. J.; KINNEY, J. H. et al. The dentin substrate: structure and properties related to bonding. *J Dent.*, v. 25. p. 441–58, 1997.
- MARTINHO, F. C.; GOMES, B. P. F. A. Quantification of endotoxins and cultivable bacteria in root canal infection before and after chemomechanical preparation with 2.5% sodium hypochlorite. *J Endod.*, v. 34, p. 268–72, 2008.
- MENEZES, M. M.; VALERA, M. C.; JORGE, A. O. C.; KOGA-ITO, C. Y.; CAMARGO, C. H. R.; MANCINI, M. N. G. *In vitro* evaluation of the effectiveness of irrigants and intracanal medicaments on microorganisms within root canals. *Inter Endod J.*, v. 37, p. 311–9, 2004.
- MIGUN, N. P.; AZUNI, M. A. Filling of one-side-closed capillaries immersed in liquids. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 181, 337–40, 1996.

- MIGUN, N. P.; SHNIP, A. I. Model of film flow in a dead-end conic capillary. *Journal of Engineering Physics and Thermophysics*, v. 75, p. 1422–8, 2002.
- MJOR, I. A. Human coronal dentine structure and reactions *Oral Surg.*, v. 33, p. 810-23, 1972.
- MOLANDER, A.; REIT, C.; DAHLE, N. G.; KVIST, T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *Inter Endod J.*, v. 31, p. 1-7, 1998.
- NAGAOKA, S.; MIYAZAKI, Y.; LIU, H. J.; IWAMOTO, Y.; KITANO, M.; KAWAGO, E. M. Bacterial invasion into dentinal tubules of human vital and nonvital teeth. *J Endod.*, 21, 70–3, 1995.
- NAGHILLI, R.; TAJIK, H.; MARDANI, K.; ROUHANI, S. M. R.; EHSANI, A.; ZARE P. Validation of drop plate technique for bacterial enumeration by parametric and nonparametric tests. *Vet Research Forum.*, v. 4, p. 179-183, 2013.
- NANCI, A. Ten Cate's oral histology: development, structure, and function. 8th edition. Mosby-Year Book Inc; St Louis, MO, 2012.
- ORSTAVIK, D.; HAAPASALO, M. Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. *Endod Dent Traumatol.*, v. 6, p.142-149, 1990.
- ORSTAVIK, D. Apical periodontitis: microbial infection and host responses. *Essential endodontology*, 2nd edition. Oxford, UK: Wiley Blackwell, p. 1–10, 2020.
- PAQUE, F.; LUDER, H. U.; SENER, B.; ZEHNDER, M. Tubular sclerosis rather than the smear layer impedes dye penetration into the dentine of endodontically instrumented root canals. *Inter Endod J.*, v. 39, p. 18–25, 2006.
- PARMAR, D.; HAUMAN, C. H.; LEICHTER, J. W.; MCNAUGHTON, A.; TOMPKINS, G. R. Bacterial localization and viability assessment in human ex vivo dentinal tubules by fluorescence confocal laser scanning microscopy. *Int Endod J.*, v. 44, p. 644–51, 2011.
- PARSELL, D. E.; STEWART, B. M.; BARKER, J. R. et al. The effect of steam sterilization on the physical properties and perceived cutting characteristics of extracted teeth. *J Dent Educ.*, v. 62, p. 260-263, 1998.
- PASHLEY, D. H. Dentin: a dynamic substrate—a review. *Scanning Microsc.*, v. 3, p. 161-74, 1989.
- PÉCORA, J. D.; GUERISOLI, D. M. Z.; SILVA, R. S.; VANSAN, L. P. Shelf-Life of 5% Sodium Hypochlorite Solutions. *Braz Endod J.*, v. 2, p. 43-45, 1997.
- PECIULIENE, V.; BALCIUNIENE, I.; ERIKSEN, H. M.; HAAPASALO, M. Isolation of *Enterococcus faecalis* in previously root-filled canals in a Lithuanian population. *J Endod.*, v. 26, p. 593-5, 2000.
- PEETERS, H. H.; GUTKNECHT, T. N. Efficacy of laser-driven irrigation versus ultrasonic in removing an airlock from the apical third of a narrow root canal. *Aust Endod J.*, v. 40, p. 47-53, 2014.
- PEREZ, F.; CALAS, P.; FALGUEROLLES, A.; MAURETTE, A. Migration of a *Streptococcus sanguis* strain through root dental tubules. *J Endod.*, v. 19, p. 297–301, 1993a.
- PEREZ, F.; ROCHD, T.; LODTER, J. P.; CALAS, P.; MICHEL, G. *In vitro* study of the penetration of three bacterial strains into root dentine. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.*, v. 76, p. 97-103, 1993b.
- PETERS, L. B.; WESSELINK, P. R.; MOORER, W. R. Penetration of bacteria in bovine root dentine *in vitro*. *Inter Endod J.*, v. 33, p. 28–36, 2000.
- Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Sousa EL, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J* 2003;36:1–11

- PLOTINO, G.; NAGENDRABABU, V.; BUKIET, F. et al. Influence of negotiation, glide *path* and preflaring procedures on root canal shaping – terminology, basic concepts and a systematic review. J Endod., v. 46, p. 707-729, 2020.
- PORTENIER, I.; HAAPASALO, H.; RYE, A, et al. Inactivation of root canal medicaments by dentine, hydroxylapatite and bovine serum albumin. Int Endod J., v. 34, p.184–8, 2001.
- PORTENIER, I.; HAAPASALO, H.; ORSTAVIK, D.; YAMAUCHI, M.; HAAPASALO, M. Inactivation of the antibacterial activity of iodine potassium iodide and chlorhexidine digluconate against *Enterococcus faecalis* by dentin, dentin matrix, type-I collagen, and heatkilled microbial whole cells. J Endod., v. 28, p. 634–7, 2002.
- PORTENIER I., WALTIMO T.M.T., HAAPASALO. M. *Enterococcus faecalis* – The Root Canal Survivor and ‘Star’ in Post Treatment Disease. Endod Topics., v. 6, p. 135-59, 2003.
- PINHEIRO, E. T.; GOMES, B. P.; FERRAZ, C. C.; SOUSA, E. L.; TEIXEIRA, F. B.; SOUZA-FILHO, F. J. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. Inter Endod J., v. 36, p. 1–11, 2003.
- RACE, J.; ZILM, P.; RATNAYAKE, J.; FITZSIMMONS, T. ET AL. Efficacy of laser and ultrasonic activated irrigation on eradicating a mixed species biofilm in human mesial roots. Aust Endod J., v. 45, p. 317-324, 2019.
- RAKITA, R. M.; VANEK, N. N.; JACQUES-PALAZ, K.; MEE, M. et al. *Enterococcus faecalis* bearing aggregation substance is resistant to killing by human neutrophils despite phagocytosis and neutrophil activation. Infect Immun., v. 67, p. 6067-75, 1999.
- ROÇAS, I. N.; SIQUEIRA JR, J. F.; SANTOS, K. R. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. J Endod., v. 30, p. 315-20, 2004.
- ROGOSA, M.; MITCHELL, J. A.; WISEMAN, R. A selective medium for the isolation and enumeration of oral lactobacilli. J Dent Res., v. 30, p. 682-989, 1951.
- RUEGGBERG, F. A.; GIANNINI, M.; ARRAIS, C. A. G.; PRICE, R. B. T. Light curing in dentistry and clinical implications: a literature review. Braz. Oral Res., v. 31, p.61, 2017.
- SASSONE, L. M.; FIDEL, R. A.; FAVERI, M. et al. A microbiological profile of symptomatic teeth with primary endodontic infections. J Endod.; v. 34. p. 541–5, 2008.
- SCHIRRMEISTER, J. F.; LIEBENOW, A. L.; PELZ, K.; WITTMER, A.; SERR, A.; HELLWIG, E.; AL-AHMAD, A. New bacterial compositions in root-filled teeth with periradicular lesions. J. Endod., v. 35, p.169–174, 2009.
- SEDGLEY, C.; LENNAN, S.; APPELBE, O. Survival of *Enterococcus faecalis* in root canals ex vivo. Int Endod J., v. 38, p. 735-42, 2005.
- SHEN, Y.; QIAN, W.; CHUNG, C.; OLSEN, I.; HAAPASALO. M. Evaluation of the effect of two chlorhexidine preparations on biofilm bacteria *in vitro*: a three-dimensional quantitative analysis. J Endod., v. 35, p. 981–5, 2009.
- SINGH, B. Molecular methods for diagnosis and epidemiological studies of parasitic infections. Inter J Parasitol., v. 27, p. 1135- 1145, 1997.
- SIDDIQUI, N. A.; OWEN, J. M. Clinical advances in bone regeneration. Curr Stem Cell Res Ther., v. 8, p. 192-200, 2013.
- SIGNORETTO, C.; LIEO, M. M.; TAFI M. C.; CANEPARI, P. Cell Wall Chemical Composition of *Enterococcus faecalis* in Viable But Non Cultivable State. Appl Environ Microbiol., v. 66: p. 1953-59, 2000.

SIQUEIRA JR, J. F.; UZEDA, M.; FONSECA, M. E. F. A Scanning Electron Microscopic Evaluation of *In Vitro* Dentinal Tubules Penetration by Selected Anaerobic Bacteria. *J Endod.*, v. 22, p. 308-310, 1996.

SIQUEIRA JR, J. F.; ROÇAS, I.N. Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. *J Endod.*, v. 34, p. 1291-1301, 2008.

SIQUEIRA JR, J. F.; ROÇAS, I.N. Diversity of endodontic microbiota revisited. *J Dent Resear.*, v. 88, p. 969 - 981, 2009.

SIQUEIRA JR, J. F.; ROÇAS, I.N. Present status and future directions: Microbiology of endodontic infections. *Int Endod J.*, v. 55, p. 512-530, 2022.

SIREN, E.; HAAPASALO, M. P.; RANTA, K.; SALMI, P.; KEROSUO, E. N. Microbiological findings and clinical treatment procedures in endodontic cases selected for microbiological investigation. *Int Endod J.*, v. 30, p. 91–5, 1997.

SUNDQVIST, G.; FIGDOR, D.; PERSSON, S.; SJOGREN, U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re treatment. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endodontol.*, v. 85, p. 86–93, 1998.

STAUFFACHER, S.; LUSSI, A.; NIETZSCHE, S. et al. Bacterial invasion into radicular dentine. *Clin Oral Invest.*, v. 21, p. 1743-1752, 2017.

STUART, C. H.; SCHWARTZ, S. A.; BEESON, T. J.; OWATZ, C. B. Enterococcus faecalis: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J Endod.*, v. 32, p. 93–8, 2006.

SWIMBERGHE, R. C. D.; DE CLERCQ, A.; DE MOOR, R. J. G.; MEIRE, M. A. Efficacy of osonically, ultrasonically and laser-activated irrigation in removing a biofilm- mimicking hydro-gel from an isthmus model. *Inter Endod J.*; v. 52, p. 515– 523, 2019a.

SWIMBERGHE, R. C. D.; COENYE, T.; DE MOOR, R. J. G.; MEIRE, M. A. Biofilm model systems for root canal disinfection: a literature review. *Inter Endod J.*; v. 52, p. 604– 628, 2019b.

TAY, F. R.; GU, L. S.; SCHOEFFEL, G. J, et al. Effect of vapor lock on root canal debridement by using a side-vented needle for positive-pressure irrigant delivery. *J Endod.*, v. 36, p.745–50, 2010.

TENNERT, C.; FUHRMANN, M.; WITTMER, A.; KARYGIANNI, L.; ALTENBURGER, M. J.; PELZ, K.; HELLWIG, E.; AL-AHMAD, A. New bacterial composition in primary and persistent/secondary endodontic infections with respect to clinical and radiographic findings. *J. Endod.*, v. 40, p. 670–677, 2014.

TENNERT., C.; DREWS, A.M.; WALTHER, V.; ALTENBURGER, M.J.; KARYGIANNI, L.; WRBAS, K.T.; HELLWIG, E.; AL-AHMAD, A. Ultrasonic activation and chemical modification of photosensitizers enhances the effects of photodynamic therapy against *Enterococcus faecalis* root-canal isolates. *Photodiagn. Photodyn. Ther.*, v. 12, p. 244–251, 2015.

TIBURCIO-MACHADO, C. S.; MICHELON, C.; ZANATTA, F. B. et al. The global prevalence of apical periodontitis: a systematic review and meta- analysis. *Inter Endod J.*, v. 54, p. 712– 735, 2021.

TRONSTAD, L. Ultrastructural observations on human coronal dentine. *Scand J Dent Res.*, v. 81, p. 101-11, 1973.

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.*, v. 38, p. 200–3, 2012

VIANNA, M. E.; GOMES, B. P. F. A.; BERBER, V. B.; ZAIA, A. A.; FERRAZ, C. C. R.; SOUZA-FILHO, F. J. *In vitro* evaluation of the antimicro-bial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. *OralSurg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol and Endod.*, v. 97, p.79–84, 2004.

VIVACQUA-GOMES, N.; GURGEL-FILHO E.D.; GOMES, B. P. F. A.; FERRAZ C. C. R.; ZAIA, A. A.; SOUZA-FILHO, F. J. Recovery of *Enterococcus faecalis* after single or multiple-visit root canal treatments carried out in infected teeth ex vivo. *Inter Endod J.*, v. 38, p. 697–704, 2005.

WEIGER, R., DE LUCENA, J.; DECKER, H. E.; LOST, C. Vitality status of microorganisms in infected human root dentine. *Inter Endod J.*, v. 35, p. 166–71, 2002.

WESTERGREEN, G.; KRASSE, B. Evaluation of a micromethod for determination of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* infection. *J Clin Microbiol.*, v. 7, p. 82-83, 1978.

YOUNG, G.; TURNER, S.; DAVIES, J. K.; SUNDQVIST, G.; FIGDOR, D. Bacterial DNA persists for extended periods after cell death. *J Endod.*; v. 33, p. 1417–20, 2007.

ZAPATA, R.O.; BRAMANTE, C. M.; DE MORAES, I. G. et al. Confocal laser scanning microscopy is appropriate to detect viability of *Enterococcus faecalis* in infected dentin. *J Endod.*, v. 34, p. 1198–201, 2008.

ZHANG, C.; DU, J.; PENG, Z. Correlation between *Enterococcus faecalis* and persistent intraradicular infection compared with primary intraradicular infection: a systematic review. *J Endod.*, v. 41, n. 8, p. 1207–1213, 2015.

ANEXO I – TERMO DE CESSÃO DE DENTES



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA
TERMO DE CESSÃO

Eu, _____,
portador(a) da Carteira de Identidade nº _____, por meio deste instrumento,
declaro que estou doando o(s) dente (s) _____, o(s) qual(is)
foi(ram) extraído(s) por indicação periodontal e serão exclusivamente usados para a pesquisa
**“Quantificação microbiana em lúmen e túbulos dentinários de 3 protocolos de
contaminação *in vitro*”**. Declaro, também, que recebi todas as orientações sobre os riscos e objetivos
da pesquisa, e que todos os meus dados serão mantidos em sigilo, conforme Resolução CNS 466/2012,
que estabelece normas para pesquisa envolvendo seres humanos, assim como, poderei remover o
consentimento da pesquisa sem haver penalidade alguma e posso obter informações sobre o andamento da
pesquisa através dos seguintes meios:

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina – Campos Florianópolis – SC
Centro de Ciências da Saúde – Departamento de Odontologia
Rua Delfino Conti, 1240, Bairro Trindade, Florianópolis – SC

Contatos: Profª. Drª. Thais Mageste Duque – (48) 3721 3434 – thais.mageste@ufsc.br
Heloisa Cardoso Martins – (48) 99657 0428 – endohelo@gmail.com

FLORIANÓPOLIS, _____ de _____ de 202__

Assinatura do Doador ou Responsável Legal

Thais Mageste Duque – Pesquisadora Responsável

Heloisa Cardoso Martins – Pesquisadora

ANEXO II – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O senhor(a) está sendo convidado, por mim **Heloisia Cardoso Martins** (aluna de pós-graduação da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC), orientada da **Prof^a. Dr^a. Thais Mageste Duque** (Professora do Departamento de Odontologia da USFC), a participar de uma pesquisa intitulada “**Quantificação microbiana em lúmen e túbulos dentinários de 3 protocolos de contaminação *in vitro***”, que tem como objetivo principal comparar, *in vitro* (no laboratório), qual dos três protocolos é eficaz em contaminar de forma consistente e homogênea o sistema de canais radiculares com a bactéria *Enterococcus faecalis*.

Para isso, precisamos usar dentes extraídos a fim de entender melhor a ação dessa solução sob métodos de ativação no interior do canal radicular. Você está realizando a extração do seu dente por motivos de seu interesse, que não se relacionam com nossa pesquisa, tais como: tratamento ortodôntico (corrigir dentes tortos) ou por não haver mais meios de recuperar o dente. Então, pedimos gentilmente, que após a extração faça a doação do seu dente e nos ajude a realizar a pesquisa. Você não terá prejuízo nenhum, pois, como já citado, o seu dente está sendo extraído por motivos de seu interesse, e seria descartado ou armazenado por você após extração. A realização dessa pesquisa é justificada, porque a combinação de diferentes substâncias na terapia fotodinâmica pode favorecer e aprimorar a desinfecção do canal radicular.

Sua participação é voluntária e caso você não queira participar, isso não lhe trará nenhum problema. Também é garantida a liberdade da retirada deste consentimento a qualquer momento da pesquisa. Além disso, será garantido o sigilo, o respeito e a privacidade dos participantes, assim como a garantia de indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa, de acordo com a Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde (CNS).

Você poderá apresentar desconforto e sensibilidade no local devido à cirurgia que é uma consequência possível no pós-operatório cirúrgico. Para evitar esse possível risco, a equipe responsável pela extração realizará um tratamento tranquilo, seguro e prescreverá medicação analgésica ou anti-inflamatória após o procedimento. Assim, não há riscos diretos relacionados ao estudo, apenas aqueles inerentes aos procedimentos de extração. Acrescentamos ainda que, apesar dos esforços e das providências necessárias tomadas pelos pesquisadores, sempre existe a remota possibilidade de quebra de sigilo, ainda que involuntária e não intencional.

Seus dados serão arquivados por um período de cinco anos após o término da pesquisa e, posteriormente, serão incinerados conforme recomendações éticas. Não haverá benefício direto para você. Além disso, sua participação é voluntária e você não receberá compensação financeira para participar da pesquisa.

Em caso de gastos comprovadamente resultantes da pesquisa, garante-se o direito ao ressarcimento conforme recomenda a resolução vigente. No entanto, no final da pesquisa, será possível

definir uma melhor estratégia de contaminação *in vitro* do canal radicular, além de contribuir para o avanço nas pesquisas nesta linha de estudo.

Em qualquer momento você poderá entrar em contato com os pesquisadores por telefone ou e-mail, no qual estarão disponíveis para fornecer todas as informações e sanar dúvidas a respeito deste estudo, tendo o direito de retirar o seu consentimento de participação.

O presente documento, que está sendo assinado, caso concorde em participar do estudo, é confidencial. Este termo foi redigido em duas vias, que deverão ser rubricadas em todas as suas páginas e assinadas, ao seu término, pelo participante e pelas pesquisadoras responsáveis. Uma via será destinada ao participante do estudo e a outra via às pesquisadoras responsáveis. O senhor(a) receberá uma cópia desse consentimento, onde consta o endereço e o telefone das pesquisadoras principais.

Dúvidas sobre essa pesquisa, envolvendo princípios éticos, poderão ser questionadas ao Comitê de Ética em Pesquisa da UFSC (CEPSH, localizado no Prédio Reitoria II, 4º andar, sala 401, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, Trindade, Florianópolis/SC. Fone: (48) 3721-6094, e-mail: cep.propesq@contato.ufsc.br. Horário de funcionamento: 2ª a 6ª feira – 10:00 às 12:00 h e 16:00 às 18:00 h. O CEPSH é um órgão colegiado interdisciplinar, deliberativo, consultivo e educativo, vinculado à Universidade Federal de Santa Catarina, mas independente na tomada de decisões, criado para defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade e para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos.

Se não há nenhuma dúvida em relação a esta pesquisa e se concorda em participar, solicitamos que assine este Termo de Consentimento. Agrademos desde já a sua atenção e sua colaboração, colocamo-nos à sua disposição para quaisquer esclarecimentos.

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina – Campos Florianópolis – SC
Centro de Ciências da Saúde – Departamento de Odontologia
Rua Delfino Conti. 1240, Bairro Trindade, Florianópolis – SC

Contatos: Profª. Drª. Thais Mageste Duque – (48) 3721 3434 – thais.mageste@ufsc.br
Heloisa Cardoso Martins – (48) 99657 0428 – endohelo@gmail.com

FLORIANÓPOLIS, _____ de _____ de 202__

Assinatura do Doador ou Responsável Legal

Thais Mageste Duque – Pesquisadora Responsável

Heloisa Cardoso Martins – Pesquisadora