

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

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL DE DESCONTAMINAÇÃO DE
CANAIS RADICULARES INFECTADOS COM *ENTEROCOCCUS FAECALIS* E
DA CAPACIDADE DE DISSOLUÇÃO TECIDUAL ATRAVÉS DO USO DA
TERAPIA FOTODINÂMICA E DO HIPOCLORITO DE SÓDIO**

MATHEUS ALBINO SOUZA

PORTO ALEGRE / 2011

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

MATHEUS ALBINO SOUZA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL DE DESCONTAMINAÇÃO DE
CANALIS RADICULARES INFECTADOS COM *ENTEROCOCCUS FAECALIS* E
DA CAPACIDADE DE DISSOLUÇÃO TECIDUAL ATRAVÉS DO USO DA
TERAPIA FOTODINÂMICA E DO HIPOCLORITO DE SÓDIO**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos obrigatórios para a obtenção do título de Mestre em Odontologia, área de concentração em Endodontia.

ORIENTADOR: PROF. DR. JOSÉ ANTÔNIO POLI DE FIGUEIREDO

PORTO ALEGRE / 2011

*“Nas grandes batalhas
da vida, o primeiro passo para a
vitória é o desejo de vencer”.*

(Mahatma Gandhi)

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, que me iluminou, me fez seguir em frente nas vitórias, me ergueu nas dificuldades e me encorajou a ir até o fim.

Aos meus pais, **Antônio** e **Sandra**, exemplos de vida que me deram educação, ensinaram valores, abdicaram de seus sonhos para que eu tivesse a oportunidade de realizar o meu, que não mediram esforços em mostrar o caminho correto e que me incentivaram fazendo seguir adiante fossem quais fossem os obstáculos – amor eterno.

Aos meus irmãos, **Diogo** e **Tiago**, que me ensinaram tantas coisas, em quem sempre me espelhei por tudo que conquistaram, pela amizade, companheirismo, incentivo, cumplicidade e torcida incondicional durante todo esse período.

Ao diretor da Faculdade de Odontologia da PUC/RS, **Prof. Marcos Túlio Mazzini Carvalho**, e ao coordenador do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da PUC/RS, **Prof. Dr. José Antônio Poli de Figueiredo**, que viabilizaram esta oportunidade de aprendizado e crescimento.

Ao **CNPq**, pelo fornecimento da bolsa que me possibilitou suporte financeiro para a conclusão deste mestrado.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. José Antônio Poli de Figueiredo**, cuja sabedoria, trabalho, conhecimento e dedicação à ciência são admiráveis. Agradeço pela acolhida e comprometimento com o desenvolvimento da dissertação. A contribuição para o meu crescimento pessoal e profissional foi imensurável neste período. Seus ensinamentos, idéias, teorias, conselhos, percepções e, principalmente, a sua amizade jamais serão esquecidos. Obrigado pelo convívio e pela honra de desenvolver esse trabalho em conjunto, estimado Mestre.

Ao professor e amigo, **Dr. João Vicente Barbizam**, exemplo de determinação, organização e coerência atrás de um objetivo e na realização de um trabalho. Presente desde o início da jornada, mostrando quais eram os caminhos corretos a seguir, estando sempre disposto a ajudar quando tudo significava incerteza, dúvida e dificuldade, apresentando em todas as ocasiões o apoio e o incentivo. A gratidão será eterna por ter sido o principal responsável por eu ter escolhido a Endodontia como área a seguir dentro da Odontologia.

Aos professores, **Dr. Caio César Randi Ferraz** e **Dra. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes**, pelos conhecimentos teóricos e práticos transmitidos durante o curso de especialização e que até hoje fazem parte do meu cotidiano acadêmico e clínico. É muito bom saber que, apesar da distância e do transcorrer do tempo, ainda posso contar com a amizade, o convívio, o trabalho, o incentivo e a torcida contínua de vocês.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, área de concentração em Endodontia, **Dr. Eraldo Batista**, **Dra. Maria Martha Campos**, **Dr. João Webber** e **Dra. Patrícia Kopper**, pelas aulas e ensinamentos transmitidos, pela disposição e atenção de sempre, sendo fundamentais para a conclusão de mais uma etapa. A presença de vocês foi gratificante para a obtenção do aprendizado.

Aos professores do departamento de Endodontia da Graduação da Faculdade de Odontologia, **Ms. Alexandre Ghisi**, **Dra. Fabiana Vier**, **Dr. Márcio Menin**, **Dra. Maristela Borba** e **Dra. Simone Luisi**, pelo convívio do dia-a-dia na clínica de Endodontia, pelas sugestões, questionamentos e propostas a cerca da realização deste trabalho. A amizade, experiência e o amparo de vocês foram indispensáveis nesta conquista.

À professora, **Dra. Silvia Dias de Oliveira**, e ao aluno de graduação e iniciação científica em Biologia, **Valdir Barth Júnior**, pelo auxílio na realização da parte microbiológica do experimento da dissertação. Agradeço pelo convívio, pela troca de conhecimentos e por não me deixarem desanimar quando as amostras contaminavam com microorganismos que não deveriam contaminar. Aprendi muito mais que biologia, microbiologia e bactérias, aprendi sobre amizade, paciência, cuidados, determinação e dedicação exaustiva beirando a perfeição. Sem vocês, essa dissertação jamais estaria sendo escrita.

Ao professor, **Dr. Mario Wagner**, pelo auxílio e competência na realização da análise estatística desse trabalho.

Ao funcionário do Centro de Microscopia e Microanálises, **Maurício França**, pelo auxílio no preparo, processamento e aquisição de imagens das amostras na microscopia eletrônica de varredura. Suas conversas e histórias ajudaram o tempo a passar um pouco mais rápido, quando a análise das imagens beirava o sono. Sua dedicação, agilidade e precisão foram peças-chave para complementação deste trabalho.

Aos colegas, **Alessandra Trindade**, **Andrea Fredrich**, **Carina Follmann**, **Carlos Wolle**, **Caroline Marca**, **Charles Pereira**, **Claudia Wagner**, **Deborah Cogo**,

Fernanda Lopez, Grasiela Grundling, Janaina Kufner, Kathrein Tapia, Larissa Klassmann, Lenara Dondoni, Marilia Burgel, Pabla Sechi, Renata Morgental e Roberta Scarparo, pela amizade e companheirismo ao longo desses dois anos.

Aos amigos e colegas de Endodontia, **Dr. Douglas Cecchin** e **Dr. Francisco Montagner**, pelas conversas, troca de conhecimentos, pelos momentos de descontração, pelos trabalhos realizados juntos, pelo auxílio e atenção de sempre, e, acima de tudo, pela enorme amizade constituída e fortalecida ao longo desses anos. É um prazer e uma honra ter pessoas como vocês do meu lado. Não tenho dúvidas que sempre poderei contar com vocês pra tudo e tenham certeza que não medirei esforços pra retribuir. A consideração que tenho a vocês vai além de um simples muito obrigado. Devo muito a vocês, pessoas especiais que eternamente serei grato por tudo que me acrescentaram.

Aos alunos da graduação, **ATO 2010 (turmas A e C)**, **ATO 2011 (turmas A e C)** e **ATO 2012 (turma A)**, pela confiança e tranqüilidade transmitidas durante a realização do estágio docente, requisito obrigatório para a conclusão do Mestrado.

Aos funcionários da Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, **Ana Prestes, Davenir Bruschi, Marcos Corrêa e Paulo Silva**, pela simpatia, competência e disponibilidade no trabalho realizado.

À funcionária do almoxarifado da clínica de Endodontia, **Luciane Gonçalves**, sempre prestativa no dia-a-dia da clínica e que ajudava a amenizar o longo e exaustivo turno de trabalho.

Às funcionárias da esterilização, **Daena Viegas e Denise Barbosa**, pela organização, pontualidade e cuidado na esterilização das amostras utilizadas no experimento.

Ao amigo, **Julio Vogt**, com quem dividi residência e me transmitiu tudo aquilo que eu deveria saber sobre a capital no meu primeiro ano em Porto Alegre. Agradeço pela paciência, por dividir seu espaço, pelo convívio e pela amizade que dura até hoje.

E, concluindo, agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

ARTIGO 1

RESUMO

O objetivo deste estudo foi comparar, *in vitro*, a ação da terapia fotodinâmica com a ação do hipoclorito de sódio em canais radiculares infectados com *Enterococcus faecalis*. Os canais radiculares de 45 dentes humanos unirradiculares foram ampliados até a lima 60, autoclavados, inoculados com uma suspensão de *Enterococcus faecalis* e incubados por 60 dias, com renovação do meio de cultura de 48 em 48 horas. Após o período de contaminação, as amostras foram divididas aleatoriamente em cinco grupos, de acordo com o protocolo de descontaminação: G1 (n=5) controle positivo – nenhum procedimento; G2 (n=10) controle negativo – água destilada; G3 (n=10) – PAD; G4 (n=10) – NaOCl 2,5%; G5 (n=10) – NaOCl 2,5% + PAD. Posteriormente, as amostras foram fixadas em glutaraldeído 25%, desidratadas, secas, metalizadas e submetidas à microscopia eletrônica de varredura (MEV). A avaliação foi feita em imagens do MEV com o aumento de 5.000x para a luz do canal e de 10.000x para a interface dentinária, ambos em backscattering (BS), observando o efeito dos tratamentos propostos nos diferentes terços do canal radicular. A presença de bactérias foi classificada por intermédio de um ranqueamento de posições de 1 a 45, onde quanto maior o valor, maior o grau de limpeza da amostra. Os dados de níveis de contaminação foram submetidos ao teste de ANOVA de uma via, seguido pelo post-hoc de Tukey ($\alpha=0,05$). Os resultados mostraram que o grupo 5 apresentou os maiores valores na média de ranqueamento de posições nos três terços do canal radicular, tanto na luz do canal quanto na interface dentinária. Com isso, foi o mais efetivo na eliminação de *Enterococcus faecalis*. Diante do exposto, é possível concluir que a associação NaOCl 2,5% + PAD foi eficiente na eliminação de *Enterococcus faecalis* presentes na parede dentinária e na profundidade de penetração dos túbulos dentinários.

Palavras-chave: terapia fotodinâmica, hipoclorito de sódio, *Enterococcus faecalis*.

ARTIGO 2

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade de dissolução do tecido pulpar bovino através da ação da terapia fotodinâmica. Vinte fragmentos de tecido pulpar bovino foram pesados e divididos aleatoriamente dentro de quatro grupos (n=5), de acordo com o mecanismo de dissolução testado: G1 – água destilada (controle negativo); G2 – hipoclorito de sódio 1% (controle positivo); G3 – terapia fotodinâmica; G4 – hipoclorito de sódio + terapia fotodinâmica. A observação dos eventos de dissolução foi realizada por dois observadores cegados em relação ao teste, com lupa de 2x de aumento, sendo anotado, em minutos, o tempo até que ocorresse a completa dissolução do tecido. O período total de observação foi de 2 horas. O tempo necessário para dissolução foi registrado em minutos (min) e a velocidade de dissolução foi calculada dividindo o peso do fragmento pulpar (mg) pelo tempo de dissolução (mg/min). Os resultados mostraram que somente o grupo 2 (NaOCl) foi capaz de promover a dissolução completa do tecido pulpar. Nos demais grupos não houve a ocorrência da dissolução completa das amostras. A média do tempo de dissolução para as amostras do grupo 2 (NaOCl) foi de 1.26 mg/min. Em conclusão, somente o hipoclorito de sódio foi capaz de dissolver os fragmentos de tecido pulpar bovino e a terapia fotodinâmica não apresentou capacidade de dissolução tecidual.

Palavras-chave: terapia fotodinâmica, hipoclorito de sódio, dissolução pulpar.

LISTA DE TABELAS DO ARTIGO 1

Tabela 1 – média e desvio padrão dos *ranks* de posições dos grupos testados nos terços apical, médio e cervical da parede do canal e interface dentinária.....21

LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO 1

Figura 1 – gráficos mostrando as médias dos *ranks* de posições dos grupos testados nos terços apical, médio e cervical da parede do canal e interface dentinária.....22

Figura 2 – microfotografias do MEV (5.000x – parede do canal) dos grupos testados no estudo.....23

Figura 3 - microfotografias do MEV (10.000x – interface dentinária) dos grupos testados no estudo.....23

LISTA DE TABELAS DO ARTIGO 2

Tabela 1 – peso e tempo de dissolução de cada amostra de tecido pulpar.....35

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	1
2 ARTIGO 1	5
2.1 Abstract.....	7
2.2 Introduction.....	8
2.3 Material and methods.....	9
2.4 Results.....	12
2.5 Discussion.....	13
2.6 References.....	16
2.7 Table 1.....	21
2.8 Figure 1.....	22
2.9 Figure 2.....	23
2.10 Figure 3.....	23
3 ARTIGO 2	24
3.1 Abstract.....	26
3.2 Resumo.....	27
3.3 Introduction.....	28
3.4 Material and methods.....	29
3.5 Results.....	30
3.6 Discussion.....	30
3.7 Conclusion.....	32
3.8 References.....	32
3.9 Table 1.....	35
4 DISCUSSÃO GERAL	36
5 REFERÊNCIAS	41
6 ANEXOS	47
7 APÊNDICES	50

1 INTRODUÇÃO GERAL

Diversos estudos têm sido conduzidos na endodontia em busca de um protocolo de limpeza que apresente quatro propriedades principais: atividade antimicrobiana, não-tóxico aos tecidos periapicais, solúvel em água e capacidade de dissolver matéria orgânica (KURUVILLA & KAMATH, 1998).

A grande maioria das alterações patológicas que acometem a polpa e os tecidos perirradiculares é de natureza inflamatória e de etiologia microbiana. Bactérias e seus produtos exercem um papel significativo na indução e, principalmente, na perpetuação de tais doenças (SUNDQVIST, 1976). Mais de cem espécies bacterianas diferentes, muitas potencialmente patogênicas, têm sido isoladas de canais radiculares infectados, com grande prevalência de bactérias anaeróbias estritas (HAAPASALO, 1989).

As espécies aeróbias ou anaeróbias facultativas também têm sido encontradas na microbiota endodôntica, associadas às infecções persistentes ou secundárias. Estas espécies podem comprometer o sucesso da terapia endodôntica, destacando-se entre elas o *Enterococcus faecalis* (MOLANDER *et al.*, 1998; SUNDQVIST *et al.*, 1998).

O *Enterococcus faecalis* é um microorganismo anaeróbio facultativo (RÔÇAS *et al.*, 2004), altamente resistente e desempenha um papel importante na etiologia de lesões perirradiculares persistentes após o tratamento de canais radiculares, sendo freqüentemente encontrado nos casos de insucesso endodôntico (EVANS *et al.*, 2002).

Tal microorganismo possui diversos fatores de virulência, incluindo enzimas líticas, citolisinas e ácido lipoprotéico, sendo capaz de catabolizar uma grande variedade de fontes de energia, permitindo, dessa forma, sua sobrevivência em ambientes de extremo pH alcalino (TENDOLKAR *et al.*, 2003) e com ausência de nutrientes em um estado metabólico mínimo (FIGDOR *et al.*, 2003). Além disso, é capaz de suprimir a ação de linfócitos, contribuindo potencialmente para o insucesso do tratamento endodôntico (LEE *et al.*, 2004).

Não se limitando aos seus fatores de virulência, o *Enterococcus faecalis* é também capaz de distribuir esta virulência entre outras espécies bacterianas, formando um biofilme, que o ajuda a ser resistente à destruição por intermédio de células fagocitárias, perpetuando a patologia (JETT *et al.*, 1994).

A prevalência de *Enterococcus faecalis* está associada com diferentes formas de patologias perirradiculares, incluindo as infecções endodônticas primárias e as infecções

endodônticas persistentes. Nas infecções endodônticas primárias, o *Enterococcus faecalis* está associado com lesões perirradiculares crônicas assintomáticas do que com abscesso perirradicular agudo ou periodontite apical aguda, podendo ser encontrado em até 40% dos casos de infecção endodôntica primária (RÔÇAS *et al.*, 2004). Nas infecções endodônticas persistentes, a percentagem de *Enterococcus faecalis* tem se mostrado muito mais elevada quando comparada às infecções endodônticas primárias, o que evidencia a sua capacidade de induzir patologias perirradiculares por sobreviver aos procedimentos intracanaís de desinfecção e persistir como patógeno no interior dos canais radiculares (PINHEIRO *et al.*, 2003), auxiliando, dessa forma, na reorganização de um novo biofilme (SEMENOFF *et al.*, 2010).

Por outro lado, a permanência de tecido pulpar residual, dentina infectada ou bactérias no interior dos canais radiculares pode ser a responsável pelo insucesso do tratamento endodôntico (MOORER & WESSELINK, 1982). Os agentes irrigantes devem apresentar a capacidade de dissolver a polpa remanescente (ZEHNDER, 2006), uma vez que a remoção do tecido pulpar é inadequada com o preparo mecânico isoladamente, devido às complexidades anatômicas do sistema de canais radiculares (THÉ, 1979).

A maioria das bactérias encontradas na microflora dos canais radiculares pode ser removida, simplesmente, através da ação mecânica dos instrumentos endodônticos. No entanto, devido à complexidade anatômica do sistema de canais radiculares, bactérias e resíduos orgânicos localizados profundamente nos túbulos dentinários, bem como em regiões de istmos e reentrâncias, podem não ser alcançados (FERRAZ *et al.*, 2001).

Diversas substâncias e recursos têm sido utilizados durante e imediatamente após o preparo dos canais radiculares no intuito de remover detritos e tecido pulpar necrótico, além de ajudar na neutralização dos microorganismos que não puderam ser eliminados pela instrumentação mecânica (SAFAVI *et al.*, 1990).

O hipoclorito de sódio é a substância química auxiliar mais frequentemente utilizada na endodontia atualmente (IZU *et al.*, 2004). Este composto apresenta uma série de propriedades e vantagens, entre as quais se inclui a capacidade de dissolver matéria orgânica (ZEHNDER *et al.*, 2003; OKINO *et al.*, 2004) e o amplo espectro antibacteriano que possibilita a eliminação efetiva de microorganismos do canal radicular (JEANSONNE & WHITE, 1994) e do interior dos túbulos dentinários (BUCK *et al.*, 2001). A concentração e a temperatura interferem na ação antimicrobiana e na

capacidade de dissolução tecidual do hipoclorito de sódio, onde quanto maior a concentração e a temperatura, maior a atividade antimicrobiana e mais rápida a dissolução tecidual (KOSKINEN *et al.*, 1980; ABOU-RASS & JASTRAB, 1992).

Além disso, o hipoclorito de sódio apresenta outras propriedades e vantagens como baixa tensão superficial representando sua elevada capacidade de penetração, desodorizador, clareador de dentina, lubrificante e, ainda, detergente, pois promove a saponificação de lipídios (BLOOMFIELD & MILES, 1979).

Entre as suas desvantagens, é instável ao armazenamento e é inativado por matéria orgânica (LOPES & SIQUEIRA JR., 2004), é extremamente citotóxico quando extravasado no interior dos tecidos perirradiculares (CHANG *et al.*, 2001), diminui a resistência à fratura dos dentes e a resistência de união dos materiais restauradores à dentina (CECCHIN *et al.*, 2009).

Segundo alguns estudos, o hipoclorito de sódio é capaz de desinfetar os túbulos dentinários e a dentina radicular contaminada por *Enterococcus faecalis* (SIQUEIRA *et al.*, 1997; DUNAVANT *et al.*, 2006; BERBER *et al.*, 2006) e apresenta capacidade de dissolução tecidual (ZEHNDER *et al.*, 2003; OKINO *et al.*, 2004).

Entre as alternativas existentes no intuito de realizar uma eficiente limpeza e eliminação dos agentes irritantes do interior do canal radicular está a terapia fotodinâmica, que consiste na aplicação de um feixe de laser de baixa intensidade de potência associado a um meio condutor (KIMURA & WILDER-SMITH, 2000).

Uma vantagem desta nova técnica é que as complexidades anatômicas não se constituem uma barreira no processo de eliminação dos agentes irritantes do interior do canal, uma vez que o feixe de laser aplicado a partir da superfície coronária pode ser orientado em múltiplas direções através dos túbulos dentinários, atuando efetivamente nessas regiões (ODOR *et al.*, 1996).

A terapia fotodinâmica é uma nova estratégia antimicrobiana que envolve a combinação de um fotosensibilizador não-tóxico e uma fonte de luz (HAMBLIN & HASAN, 2004; SOUZA *et al.*, 2010). O fotosensibilizador, quando estimulado, reage com o oxigênio molecular produzindo espécies altamente reativas de oxigênio, que induzem injúria e destruição dos microorganismos (WAINWRIGHT, 1998; DEMIDOVA & HAMBLIN, 2004), podendo se conectar e penetrar rapidamente nas células bacterianas (FIGDOR, 2004). Sendo assim, a terapia fotodinâmica tem sido

estudada como um achado promissor no intuito de erradicar bactérias orais patogênicas que causam cáries dentárias e periodontites apicais (WILSON, 2004).

No entanto, assim como as demais alternativas de descontaminação do canal radicular, a terapia fotodinâmica apresenta algumas desvantagens. A quantidade de calor liberada, apesar de ser variável, apresenta potencial para carbonizar a dentina, anquilosar raízes, dissolver cimento e causar reabsorção radicular, bem como, necrose perirradicular, ao mesmo tempo em que microorganismos são fotosensibilizados (BAHCALL *et al.*, 1992; HARDEE *et al.*, 1994).

Diversos estudos têm mostrado que a terapia fotodinâmica apresenta potencial para maximizar a desinfecção do canal radicular (BERGMANS *et al.*, 2008; MEIRE *et al.*, 2009; LIM *et al.*, 2009; SOUZA *et al.*, 2010). No entanto, a real capacidade de limpeza da terapia fotodinâmica é um aspecto ainda a ser elucidado. Além disso, não há pesquisas relatando o comportamento da terapia fotodinâmica na dissolução de tecido orgânico.

Diante do problema exposto, caracterizado pela presença de canais radiculares infectados por microorganismos mais resistentes, como o *Enterococcus faecalis*, bem como pela presença de tecido orgânico remanescente não removido pelo preparo químico-mecânico, torna-se necessária a busca de meios que promovam uma eficiente descontaminação do canal radicular e que apresentem uma contribuição com o processo de dissolução tecidual.

O presente estudo compreende dois trabalhos apresentados sob a forma de artigos científicos. O primeiro artigo teve como objetivo comparar, *in vitro*, a ação da terapia fotodinâmica com a ação do hipoclorito de sódio em canais radiculares infectados com *Enterococcus faecalis*, analisando o potencial de descontaminação nas paredes dentinárias e no sistema de túbulos dentinários. O segundo artigo teve como objetivo avaliar a capacidade de dissolução do tecido pulpar bovino através da ação da terapia fotodinâmica.

2 ARTIGO 1

O artigo a seguir intitula-se “**In vitro effect of photodynamic therapy and sodium hypochlorite on the root canal system infected with Enterococcus faecalis**” e foi formatado de acordo com as normas do periódico *Journal of Endodontics*.

In vitro effect of photodynamic therapy and sodium hypochlorite on root canal system infected with *Enterococcus faecalis*

Matheus Albino Souza¹, Liviu Steier², Giampiero Rossi-Fedele^{1,2}, Silvia Dias de Oliveira³, Valdir Barth Júnior³, José Antônio Poli de Figueiredo¹

¹ School of Dentistry, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

² Warwick Dentistry, Warwick Medical School, Warwick, United Kingdom.

³ School of Biosciences, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

Address to correspondence: José Antonio Poli de Figueiredo. Post-Graduate Program in Dentistry - Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul – PUCRS. Av. Ipiranga 6681 Prédio 6 sala 507. CEP 90619-900 Porto Alegre - RS – Brazil. Telephone: +55 51 3320 3500 ext. 4307.

ABSTRACT

Introduction: Photodynamic therapy has been proposed to improve to root canal disinfection, but its role on certain bacterial species needs to be further elucidated. Objective: to compare, in vitro, the action of photodynamic therapy and sodium hypochlorite in root canals infected with *Enterococcus faecalis*.

Methods: The root canals of 45 single-rooted human extracted teeth were enlarged up to a file 60, autoclaved, inoculated with a suspension of *Enterococcus faecalis* and incubated for 60 days, with renewal of the culture medium every 48 hours. After that, samples were divided into five groups according to the protocol of decontamination: G1 (n = 5) positive control - no procedure; G2 (n = 10) negative control - distilled water; G3 (n = 10) - PAD, G4 (n = 10) - NaOCl 2.5%; G5 (n = 10) - NaOCl 2.5% + PAD. Subsequently, samples were fixed on 25% glutaraldehyde, dehydrated, dried, metalized and subjected to scanning electron microscopy (SEM). The assessment was made of images taken at every root third at 5.000x magnification for the canal wall and 10.000x for the exposed tubule area, both in backscattering (BS), noting the effect of proposed treatments to the different thirds of the root canal. The presence of bacteria in the images was scored by position ranks from 1 to 45, where the higher the value, the cleanliness of the sample. Data were subjected to One-way ANOVA followed by post-hoc Tukey test ($\alpha = 0.05$).

Results: Group 5 had the highest mean position ranks for all thirds of the root canal, both in canal wall and in the exposed tubule area. Thus, it was the most effective in eliminating *Enterococcus faecalis*.

Conclusion: the association NaOCl 2,5% + PAD is an efficient protocol for the elimination of *Enterococcus faecalis* present in the dentinal surface and deep into the dentinal tubules.

Key-words: photodynamic therapy, sodium hypochlorite, *Enterococcus faecalis*.

INTRODUCTION

Most pathological changes affecting pulp and periradicular tissues are inflammatory in nature and of microbial etiology. Bacteria and their products play a significant role in the induction and especially the perpetuation of such conditions (1). Despite the prevalence of anaerobic bacteria within infected root canals (2), aerobic or facultative anaerobic species have also been found in endodontic microbiota, foremost amongst them *Enterococcus faecalis* (3,4).

Enterococcus faecalis is a facultative anaerobic microorganism highly resistant (5) which plays an important role in the etiology of persistent periradicular lesions, frequently found in cases of endodontic failure (6), helping in the reorganization of a new biofilm (7). It has several virulence factors, including lytic enzymes, acid and lipoprotein cytolysin, being able to catabolize a wide variety of energy sources, enabling thus their survival in environments of extreme alkaline pH (8) and lack of nutrients in a minimum metabolic state (9). Furthermore, it is able to suppress the action of lymphocytes (10) and distribute their virulence among other bacterial species, forming a biofilm that becomes resistant to destruction by phagocytes (11).

Most bacteria found in root canal microbiota can be removed simply by mechanical action of endodontic instruments. However, due to anatomical complexities, bacteria and organic residues located deep in the dentinal tubules as well as in isthmus and recesses, may not be achieved (12), thus requiring the use of auxiliary chemical substances and alternative resources to promote decontamination.

Sodium hypochlorite is the most often used irrigating substance to assist current Endodontics (13). This compound has a number of properties and advantages, which include the broad spectrum antimicrobial activity (14,15,16) and the ability to dissolve organic matter (17,18). On the other hand, is highly cytotoxic when extravasated within the periradicular tissues (19), reduces fracture resistance of teeth (20) and affects negatively bond strength of restorative materials to dentin (21).

Photodynamic therapy is among the alternatives to implement efficient cleaning and removal of irritants from root canals (22). It combines a non-toxic photosensitizer and a light source (23). The photosensitizer, when stimulated, reacts with oxygen producing highly reactive oxygen species, which induce injury and destruction to microorganisms (24,25). One advantage of this innovative technique is that the anatomical complexities do not constitute a barrier in the process of removal of irritants from inside the canal.

The laser beam applied from the coronal surface can be oriented in multiple directions through dentin tubules, acting effectively in these regions (26). However, the actual cleaning ability of photodynamic therapy needs further elucidation.

The aim of this study was to compare the *in vitro* action of photodynamic therapy and sodium hypochlorite in infected root canals with *Enterococcus faecalis*, analyzing the potential decontamination on canal walls and dentinal tubules.

MATERIAL AND METHODS

Sample obtaining and specimen preparation

The study was approved by the Ethics Committee of the Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (protocol 1637/09). Forty five extracted human lower premolars with a single root canal were used for the present study, with straight roots, obtained from the tooth bank of the Faculty of Dentistry of the Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul. The teeth were stored in 4% formalin by the beginning of the experiment in order to preserve their properties. The crown portion was sectioned with diamond disk in the cement-enamel junction, so that the remaining roots presented a length of approximately 15 mm. The samples were sterilized in autoclave for 30 minutes at a temperature of 120° C.

Root canal preparation

All canals were prepared using the same protocol. Initially the exploration was done with number 10 k-type hand file (Dentsply / Maillefer, Ballaigues). Then, cervical third were prepared with LA Axxess 20.06 and 35.06 drills (Sybron-Endo, Glendora, USA). The working length was determined by inserting a hand file into the canal until the tip reached the apical foramen. This measure was reduced 1 mm, establishing the working length. The root canals were enlarged up to a file 60, by serial instrumentation. Distilled water in a 5 ml plastic syringe (BD, São Paulo, Brazil) coupled with a 25 mm Ultradent needle (Ultradent, Indaiatuba, Brazil) was used to irrigate the root canal, followed by aspiration, and renovated after the use of each instrument. At the end of chemo-mechanical preparation a final rinse with 17% EDTA was performed for smear layer removal, followed by drying with number 60 absorbent paper points (Tanari, Manacaru, Brazil).

Culture and inoculum preparation

The reference strain used, *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433), was obtained and activated in the Laboratory of Immunology and Microbiology, Faculty of Biosciences, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul. The bacteria were grown in BHI (Brain Heart Infusion), by 18 to 24 hours at 37 ° C in oven bacteriology.

The number of colony forming units (CFU) / mL of inoculum was determined by counting on blood agar plates. For this, the cultivation of *Enterococcus faecalis* was diluted serially at 10⁻⁸ in saline 0.85% and 0.1 mL aliquots of the dilutions 10⁻⁶, 10⁻⁷ and 10⁻⁸ were planted by scattering technique on blood agar, in duplicate. After incubation for 24 hours in a bacteriological incubator, the number of CFU / mL was determined.

The 45 samples were handled with sterile forceps in a laminar flow cabinet, immersed in closed test tubes containing 2 mL of BHI, which were inoculated 100 µL of overnight culture of *Enterococcus faecalis*. The samples were kept immersed in the bacterial culture for 60 days at a temperature of 37°C, so there would be the formation of biofilms. One third of the volume of BHI was renewed every 48 hours, continuously providing the nutrients needed to sustain bacterial growth.

Classification of treatment groups

In a laminar flow cabinet, samples were fixed in a wax base previously decontaminated to receiving each of the specimens. Initially, all root canals were irrigated with 2 ml of distilled water to remove planktonic bacteria and dried by aspiration. The samples were then randomly divided into five groups according to the method used to promote clean root canal:

Group 1 (n = 5) positive control - no decontamination procedure was performed.

Group 2 (n = 10) negative control - the root canal was filled with distilled water (Decloquimis, São Paulo, Brazil). Agitation of the solution with size 15 k-type hand file was performed for 60 seconds. The solution remained within the root canal for 3 minutes, being renewed after this period for another cycle. In total, there were four cycles of decontamination.

Group 3 (n = 10) - the root canal was filled with viscous tolonium chloride (Denfotex Light Systems Ltd., Inverkeithing, Scotland). Agitation of the solution with k-type hand file # 15 was performed for 60 seconds. The tip of the set PAD Plus (Denfotex Light Systems Ltd., Inverkeithing, Scotland) was placed in the root canal 2 mm short of

working length. Activation of low intensity laser was performed for a period of 120 seconds and an intensity of 120 mW, the tip remaining stationary, according to the manufacturer's instructions.

Group 4 (n = 10) - the same root canal irrigation protocol as performed in group 2 was adopted for this group, changing the irrigating substance, which was 2.5% sodium hypochlorite solution (Lírios, São Vicente, Brazil).

Group 5 (n = 10) - the root canal was filled with 2.5% sodium hypochlorite (Lírios, São Vicente, Brazil). Agitation of the solution with size 15 k-type hand file was performed for 60 seconds. The solution remained within the root canal for 3 minutes, being renewed after this period for another cycle. In total, there were four cycles of decontamination with this solution. After, neutralization of sodium hypochlorite was performed for photodynamic therapy protocol, which was done in the same manner as described for group 3.

For all groups, the protocol was completed by active irrigation with 2 ml of distilled water, aspiration and drying of root canals with absorbent paper cones.

SEM preparation

The samples were fixed in 25% glutaraldehyde, dehydrated in ascending series of ethanol and dried to critical point. Longitudinal grooves were performed on free surfaces of the roots with a diamond disc, being careful to not invade the root canal. A complete fracture occurred with a number 50 spatula (SS White, Rio de Janeiro, Brazil) providing two halves of each sample, which were placed on stubs for subsequent metallization with palladium gold.

Classification of results

Image acquisition was performed in the apical, middle and coronal thirds of root canal, in magnifications of 500x, 2000x, 5000x, 10000x and 20000x, at the canal wall and exposed tubule area, providing guidance to the comparative criteria. The canal wall area was targeted at the very central part of the third of the canal space. The exposed tubule area was at the site of splitting which gives a longitudinal view of the tubular system, at a site next to the area of acquisition of the canal wall. Emission of secondary electrons (SE) and backscattering (BS) were performed to verify the presence and extent of the bacteria.

The assessment was made on the BS images with 5.000x magnification for the canal wall and 10.000x for the exposed tubule area. Observations by thirds looked at the effect of treatments proposed to the full extent of the root canal.

A blind calibrated examiner assessed the presence of bacteria through a position rank score system in which a higher value of position would indicate a higher level of cleanliness in the canal wall and exposed tubule area, at each third of the root canal. Forty-five images were classified from 1 to 45, in each separate third.

Statistical analysis

Data on position rank score means of contamination were subjected One-way ANOVA followed by *post-hoc* Tukey test, with α set at 0.05. Data were analyzed using SPSS version 17.0.

RESULTS

The mean position ranks and standard deviation of samples subjected to different decontamination protocols are shown in Table 1. Figure 1 also demonstrates the difference in the mean position ranks between the groups in canal walls and exposed tubule areas respectively. Figures 2 and 3 show SEM photomicrographs of the groups tested at the canal wall (5.000x) and exposed tubule area (10.000x) respectively.

Group 5 showed the highest mean ranks in all three thirds of the root canal, both in canal walls and exposed tubule areas.

The *post-hoc* Tukey test denoted, in the canal wall at the apical third, higher mean values for group 5 than other groups, and group 4 had greater values than groups 1, 2 and 3 ($p < 0.05$). At the exposed tubule area in the same third, groups 3, 4 and 5 were higher than groups 1 and 2 ($p < 0.05$) with no statistical difference between them.

In the medium third, at the canal wall, groups 4 and 5 scored higher than groups 1, 2 and 3 ($p < 0.05$) but not statistically different between them. Group 3 had greater scores than groups 1 and 2 ($p < 0.05$). At the level of the exposed tubule area, groups 3, 4 and 5 scored higher than groups 1 and 2 ($p < 0.05$) with no statistical difference between them.

In the coronal third, at the canal wall, group 5 scored higher than groups 1, 2 and 3 ($p < 0.05$) and did not differ statistically significant from group 4. Groups 2, 3 and 4 scored higher than group 1 ($p < 0.05$) with no statistically significant difference between them. At the level of the exposed tubule area, group 5 scored higher than groups 1, 2 and 3 (p

< 0.05) and did not differ statistically from group 4. Groups 3 and 4 scored higher than groups 1 and 2 ($p < 0.05$) with no statistical difference between them.

DISCUSSION

One of the most important factors for achieving success in root canal therapy is an effective decontamination of root canal system. For this, chemical substances and alternative resources are available to perform their role concurrently with the mechanical action of endodontic instruments.

Enterococcus faecalis is a highly resistant facultative anaerobic microorganism (5) which plays an important role in the etiology of persistent periradicular lesions, frequently found in cases of endodontic failure (6). In this study, the samples were contaminated with *Enterococcus faecalis*, coming widely used as a marker for *in vitro* microbiological studies. This is because it proves to be able to successfully colonize the root canal in the form of biofilm, and invade dentinal tubules resisting to some root canal decontamination procedures (27-29).

The time of contamination of samples is a highly variable factor in the literature. Periods of 24 hours (30,31), 48 hours (32,33), 7 days (15,34-36), 14 days (37) and 21 days (38) of contamination with *Enterococcus faecalis* were used previously. However, this study determined the contamination for a period of 60 days, similar to a previous study (39). It is believed that a prolonged period of contamination and spread of *Enterococcus faecalis* is necessary to visualize the formation of a more consistent and organized biofilm, allowing adequate colonization in all areas of the root canal system. Thus, decontamination protocols can be tested effectively.

In some models the contamination is carried out on bovine teeth (34,37). These teeth are commonly used because their anatomical characters of dentinal tubules are very similar to human teeth in quantity, morphology and density, plus the ease of obtaining (40,41). This study used extracted human teeth, similar to previous studies (30-33,36), since the diameter and length of the tubules are small compared to bovine teeth. Thus, the present study adequately simulates the real clinical and anatomical conditions found in root canal system.

The root canal preparation was performed prior to inoculation (31-33), through filing up to a size 60 file and using an inert irrigating substance. Other studies performed after the inoculation, together with the auxiliary chemical substances and resources used for

decontamination (15,30,35,36,38), characterizing the chemo-mechanical preparation. The choice for previous preparation in the present study considered the assessment of the actual effect and intrinsic potential of decontamination protocols. Furthermore, it provided adequate space for carrying out the inoculation phase, since premolars can contain constricted canals. Together with that, adequate penetration and adaptation of the tip of the laser equipment was easily achieved.

SEM images in backscattering (BS) at magnifications of 5.000x for the canal walls and 10.000x for exposed tubule areas were used to evaluate the effect of the treatments proposed in the study. It differed from other many studies, where samples were collected from the root canal, plated, followed by culturing and counting of colony forming units (CFUs) (30-39). The use of SEM for evaluation can be justified by the fact that in many cases the failure of root canal treatment is due to the persistence of bacteria in areas that are inaccessible by chemo-mechanical preparation. Therefore, this method of assessment allows a better visualization of microorganisms remaining in these areas. This does not occur when the counting of CFUs, where the collection is limited to bacteria located in the canal wall and space.

The use of BS feature provides a clearer vision and accuracy of microbial components tested in the study, allowing more easily differentiate the bacteria found in dirt samples. Moreover, the evaluation on canal wall and in exposed tubule area, allows a real demonstration of the effect of the treatments proposed, since an efficient decontamination should cover not only the microbial content existing in walls of the main canal, but also microorganisms that penetrate deep into the dentinal tubules.

The results of this study showed that the group of 2.5% sodium hypochlorite + photodynamic therapy had the highest position rank means of the groups tested in the apical, middle and coronal thirds, on the level of canal walls and exposed tubule areas. Even when there was no statistically significant difference when comparing groups with similar results, the mean ranks of group 5 were the greatest among them. This shows that was the group which had been more effective in eliminating *Enterococcus faecalis* from inside the root canal system. Similar results were found in a previous study (36), which assessed the antimicrobial effect of photodynamic therapy as an adjunct to root canal preparation using 2.5% sodium hypochlorite as auxiliary chemical substance. The groups which the association was performed were more effective in eliminating *Enterococcus faecalis*. This can be explained by the high antimicrobial capacity of

sodium hypochlorite and by directing the light source through dentinal tubules. Thus, the complexities do not constitute an anatomical barrier in the process of removal of irritants from inside the root canal.

Similar results of this study were also found in a previous study (33), where evaluating the single use of 2.5% sodium hypochlorite and photodynamic therapy was found that these decontamination protocols showed higher results than control groups, no statistically significant difference between them. As in the present study, although not denoting much difference, the groups where 2.5% sodium hypochlorite was used as a decontamination protocol showed the highest decontamination in samples inoculated with *Enterococcus faecalis*.

The best results for the association of sodium hypochlorite and PAD occurred at the apical third. Possibly, the fact that the light source was placed at 2 mm short of working length could have influenced these results. It is feasible to speculate that similar light exposures should contemplate the medium and coronal thirds. Although this could increase time of the procedure, it could be a therapeutic choice considering the results found in the apical third.

Photodynamic therapy alone was inferior to 2.5% sodium hypochlorite and association of 2.5% sodium hypochlorite + photodynamic therapy. These findings are contrary to those found by previous study (31), which found superior results with sodium hypochlorite. This can be explained by the low concentration of sodium hypochlorite used in that study, which was 0.5%. Still, there was no statistically significant difference between groups.

In the groups that used PAD alone or following the use of sodium hypochlorite, figures of *Enterococcus faecalis* could be found with ruptured membranes and empty spaces (Figure 3e). Those voids seem to suggest that, in some cases the PAD acts partially, possibly where the photosensitizer and/or the light source did not reach the area completely.

This study suggests that the use of photodynamic therapy can be an adjunct to chemo-mechanical preparation. In addition to the chemical action of the auxiliary chemical substance and mechanical action of the endodontic instruments, there would be an additional resource capable of reaching areas of difficult access due to the anatomical complexities of the root canal system. Thus, the removal of microorganisms

commonly found in cases of endodontic infection resistant to traditional decontamination would facilitate procedures on root canal system.

In conclusion, the present study demonstrated that the use of 2.5% sodium hypochlorite as auxiliary chemical substance associated with the action of photodynamic therapy as a supplementary resource, translates into an efficient protocol for the elimination of *Enterococcus faecalis* present in the dentin surface and the depth of penetration of dentinal tubules.

REFERENCES

1. Sundqvist G. Bacteriological studies of necrotic dental pulps [dissertation]. Umea (Sweden): University of Umea; 1976.
2. Haapasalo M. Bacteroides spp in dental root canal infections. Endod Dent Traumatol 1989;5:1-10.
3. Molander A, Reit C, Dahlén G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with periapical periodontitis. Int Endod J 1998;31:1-7.
4. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U. Microbiological analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative retreatment. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 1998;85:86-93.
5. Rôças IN, Siqueira JF, Santos KRN. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. J Endod 2004;30:315–320.
6. Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. Int Endod J 2002;35:221–228.
7. Semenoff TADV, Ferreira WRS, Semenoff-Segundo A, Biasoli ER. In vitro effectiveness of Aloe vera in natura, 0.12% chlorhexidine gel, and 2% chlorhexidine gel against *Enterococcus faecalis*. J Dent Sci 2008;23:283-286.
8. Tendolkar PM, Baghdayan AS, Shankar N. Pathogenic *Enterococci*: new developments in the 21st century. Cell Mol Life Sci 2003;60:2622–2636.

9. Figdor D, Davies JK, Sundqvist G. Starvation survival, growth and recovery of *Enterococcus faecalis* in human serum. *Oral Microbiol Immunol* 2003;18(4):234-239.
10. Lee W, Lim S, Son H, Bae K. Sonicated extract of *Enterococcus faecalis* induces irreversible cell cycle arrest in phytohemagglutinin-activated human lymphocytes. *J Endod* 2004;30:209–212.
11. Jett BD, Huycke MM, Gilmore MS. Virulence of *Enterococci*. *Clin Microbiol Rev* 1994;7:462–478.
12. Ferraz CCR, Gomes BPFA, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. In vitro assessment of the antimicrobial action and the mechanical ability of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant. *J Endod* 2001;27:452-455.
13. Izu KH, Thomas SJ, Zhang P, Izu AE, Michalek S. Effectiveness of sodium hypochlorite in preventing inoculation of periapical tissues with contaminated patency files. *J Endod* 2004;30:92-4.
14. Dunavant TR, Regan JD, Glickman GN, Solomon ES, Honeyman AL. Comparative evaluation of endodontic irrigants against *Enterococcus faecalis* biofilms. *J Endod* 2006;32:527-531.
15. Oliveira DP; Barbizam JV; Trope M; Teixeira FB. In vitro antibacterial efficacy of endodontic irrigants against *Enterococcus faecalis*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007;103:702-706.
16. Martinho FC, Gomes BPFA. Quantification of endotoxins and cultivable bacteria in root canal infection before and after chemomechanical preparation with 2.5% sodium hypochlorite. *J Endod* 2008;34:268-272.
17. Zehnder M, Grawehr M, Hasselgren G, Waltimo T. Tissue-dissolution capacity and dentin-disinfecting potential of calcium hydroxide mixed with irrigating solutions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003;96:608–613.
18. Okino LA, Siqueira EL, Santos M, Bombana AC, Figueiredo JA. Dissolution of pulp tissue by aqueous solution of chlorhexidine digluconate and chlorhexidine digluconate gel. *Int Endod J* 2004;37(1):38-41.

19. Chang YC, Huang FM, Tai KW, Chou MY. The effect of sodium hypochlorite and chlorhexidine on cultured human periodontal ligament cells. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001;92:446–50.
20. Derek-White J, Lacefield WR, Chavers LS, Eleazer PD. The effect of three commonly used endodontic materials on the strength and hardness of root dentin. *J Endod* 2002;28:828-830.
21. Cecchin D, Farina AP, Barbizam JVB, Paranhos MPG, Carlini Júnior B. Effects of endodontic irrigants solutions on the adhesive bond strength to dentin. *Braz Dent J* In press 2009.
22. Kimura Y, Wilder-Smith P. Lasers in endodontic: a review. *Int Endod J* 2000;33:173-185.
23. Hamblin MR, Hasan T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem Photobiol Sci* 2004;3:436–450.
24. Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J Antimicrob Chemother* 1998;42:13–28.
25. Demidova TN, Hamblin MR. Photodynamic therapy targeted to pathogens. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2004;17:245–254.
26. Odor TM, Watson TF, Pitt Ford TR, McDonald F. Pattern of transmission of laser light in teeth. *Int Endod J* 1996;29:228-234.
27. Love RM. *Enterococcus faecalis* – a mechanism for its role in endodontic failure. *Int Endod J* 2001;34:399–405.
28. Sedgley CM, Lennan SL, Appelbe OK. Survival of *Enterococcus faecalis* in root canals ex vivo. *Int Endod J* 2005;38:735–742.
29. George S, Kishen A, Song KP. The role of environmental changes on monospecies biofilm formation on root canal wall by *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 2005;31:867–72.

30. Siqueira-Jr JF, Rôças IN, Favieri A, Lima KC. Chemomechanical reduction of the bacterial population in the root canal after instrumentation and irrigation with 1%, 2.5%, and 5.25% sodium hypochlorite. *J Endod* 2000;16:331-334.
31. Garcez AS, Núñez SC, Lage-Marques JL, Jorge AOC, Ribeiro MS. Efficiency of NaOCl and laser-assisted photosensitization on the reduction of *Enterococcus faecalis* in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;102:93-98.
32. Bergmans L, Moisiadis P, Huybrechts B, Van Meerbeek B, Quirynen M, Lambrecht P. Effect of photo-activated disinfection on endodontic pathogens ex vivo. *Int Endod J* 2008;41:227-239.
33. Meire MA, De Prijcks K, Coenye T, Nelis HJ, De Moor JG. Effectiveness of different laser systems to kill *Enterococcus faecalis* in aqueous suspension and in an infected tooth model. *Int Endod J* 2009;42:351-359.
34. Gomes BPF, Souza SFC, Ferraz CCR, Teixeira FB, Zaia AA, Valdrighi L, Souza-Filho FJ. Effectiveness of 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis* in bovine root dentine in vitro. *Int Endod J* 2003;36:267-275.
35. Dametto FR, Ferraz CCR, Gomes BPF, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. 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 Endod* 2005;99:768-772.
36. Souza LC, Brito PRR, Oliveira JCM, Alves FRF, Moreira JL, Sampaio-Filho HR, et al. Photodynamic therapy with two different photosensitizers as a supplement to instrumentation/irrigation procedures in promoting intracanal reduction of *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 2010;36:292-296.
37. Krause TA, Liewehr FR, Hahn CL. The antimicrobial effect of MTAD, sodium hypochlorite, doxycycline, and citric acid on *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 2007;33:28-30.
38. Berber VB, Gomes BPF, Sena NT, Vianna ME, Ferraz CCR, Zaia AA et al. Efficacy of various concentrations of NaOCl and instrumentation techniques in reducing *Enterococcus faecalis* within root canals and dentinal tubules. *Int Endod J* 2006;39(1):10-17.

39. Gurgel-Filho ED, Vivacqua-Gomes N, Gomes BPFA, Ferraz CCR, Zaia AA, Souza-Filho FJ. *In vitro* evaluation of the effectiveness of the chemomechanical preparation against *Enterococcus faecalis* after single- or multiple-visit root canal treatment. Braz Oral Res 2007;21:308-313.

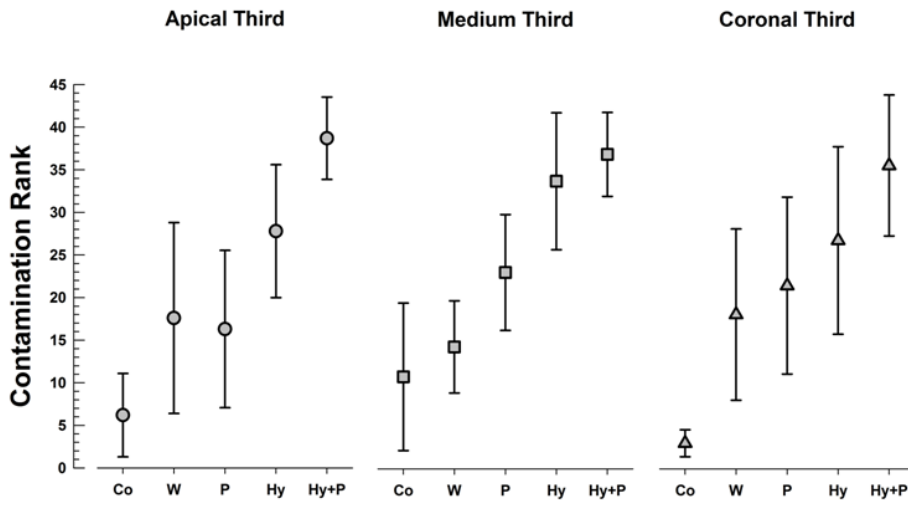
40. Haapasalo M, Orstavik D. In vitro infection and disinfection of dentinal tubules. J Dent Res 1987;66:1375-1379.

41. Orstavik D, Haapasalo M. Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. Endod Dent Traumatol 1990; 6:142-149.

Table 1 – mean and standard deviation of position ranks of the groups tested in the apical, middle and coronal thirds of the canal walls and exposed tubule area.

Group	Apical third		Medium third		Coronal third	
	Canal wall	Exposed tubule	Canal wall	Exposed tubule	Canal wall	Exposed tubule
1	6.2±4.9	5.8±5.5	7.0±9.6	6.0±3.1	3.0±1.5	7.8±8.2
2	17.6±11.1	10.1±5.5	10.9±6.0	11.7±7.1	18.1±10.0	11.6±8.9
3	16.3±9.2	30.7±11.8	20.6±7.5	24.4±11.7	21.5±10.3	25.1±10.4
4	27.8±7.8	26.6±7.4	32.5±8.9	30.3±6.5	26.8±11.0	26.5±8.8
5	38.6±4.8	33.2±7.6	36.0±5.4	34.1±10.2	35.6±8.2	36.4±7.4

Canal Wall



Exposed Tubule Area

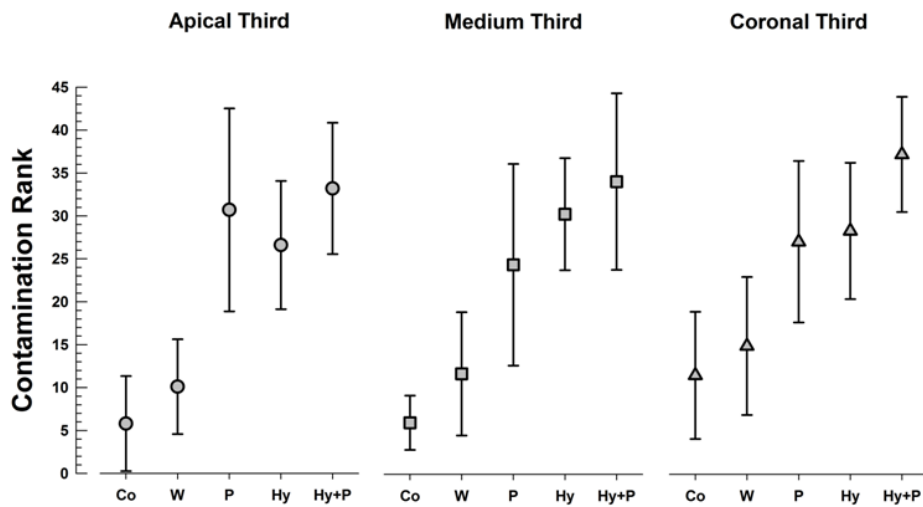


Figure 1 - graphs showing position rank means of the groups tested at the apical, middle and coronal thirds of the canal wall and exposed tubule area / Co = positive control, W = distilled water, P = PAD; Hy = 2,5% sodium hypochlorite; Hy + P = 2,5% sodium hypochlorite + PAD.

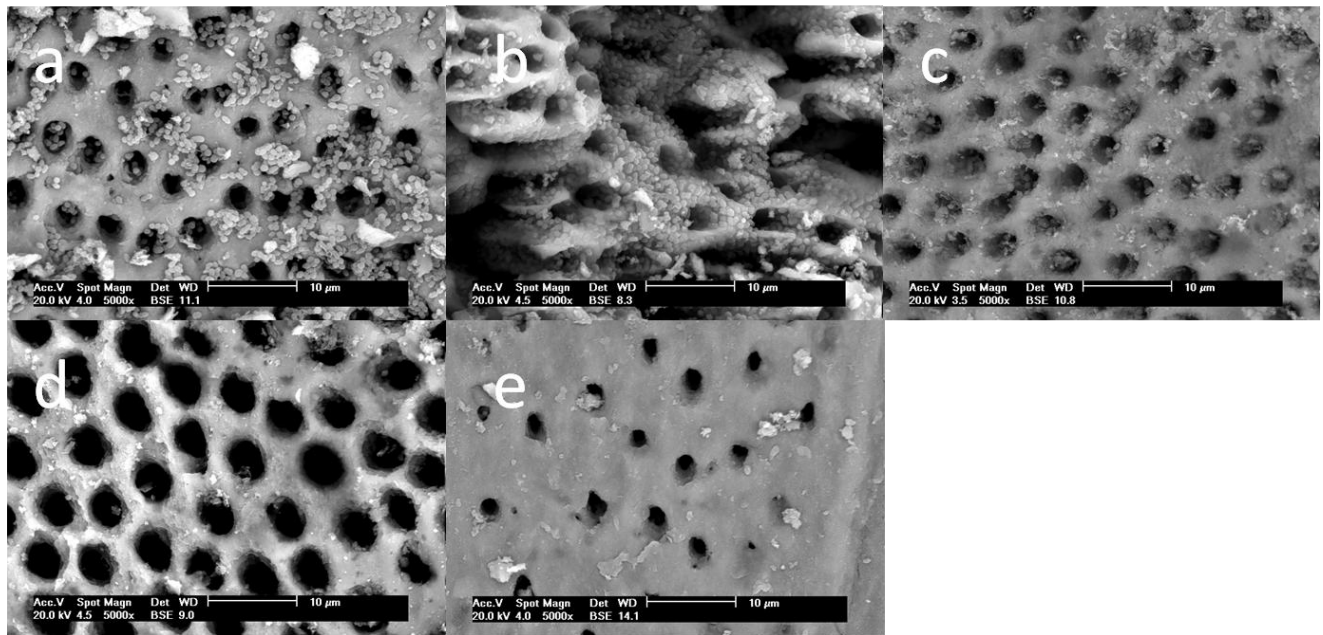


Figure 2 – SEM photomicrographs (5000x – canal wall) of the groups under study – a: 1 (positive control); b: 2 (distilled water); c: 3 (PAD); d: 4 (2.5% sodium hypochlorite); e: 5 (2.5% sodium hypochlorite + PAD).

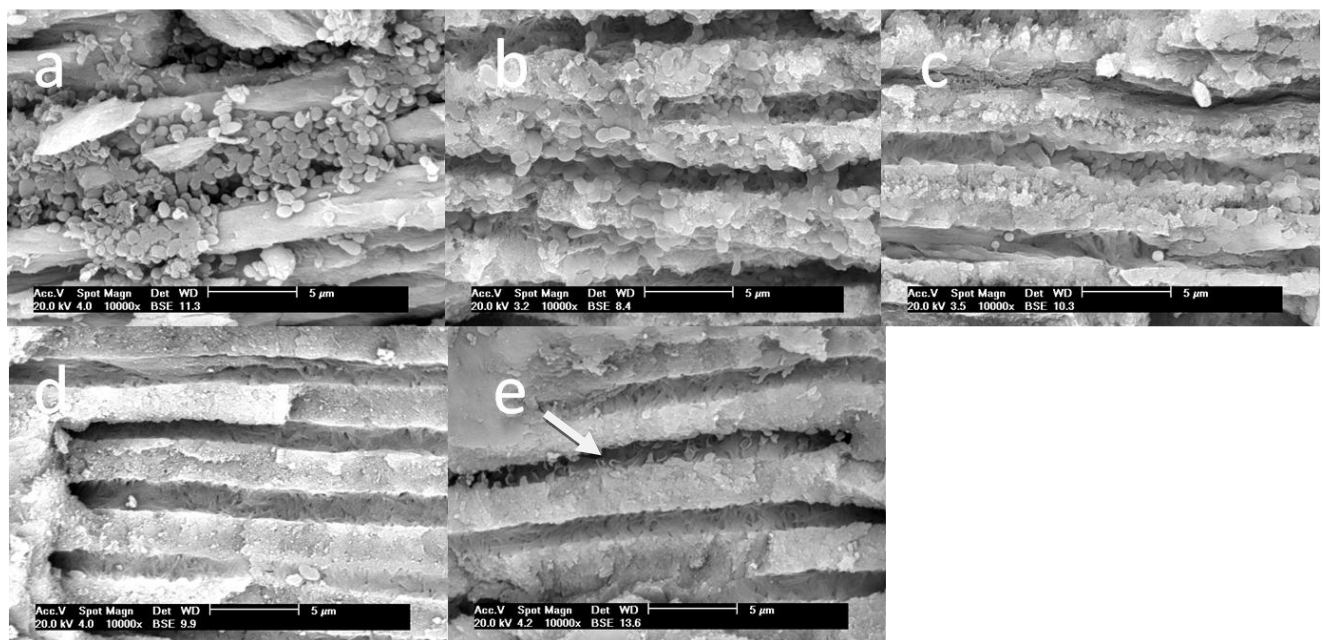


Figure 3 – SEM photomicrographs (10,000x – exposed tubule area) of the groups under study – a: 1 (positive control); b: 2 (distilled water); c: 3 (PAD); d: 4 (2.5% sodium hypochlorite); e: 5 (2.5% sodium hypochlorite + PAD). Please note the figures of *Enterococcus faecalis* with ruptured membranes and empty spaces (arrow).

3 ARTIGO 2

O artigo a seguir intitula-se “**Analysis of ability of bovine pulp tissue dissolution by photodynamic therapy – in vitro study**” e foi formatado de acordo com as normas do periódico *Journal of Dental Science*.

Analysis of bovine pulp tissue dissolution ability by photodynamic therapy – in vitro study

Análise da capacidade de dissolução de tecido pulpar bovino através da terapia fotodinâmica: estudo *in vitro*

Liviu Steier¹, Giampiero Rossi-Fedele^{1,2}, Monique Acauan¹, Priscila Bianchini¹,
Matheus Albino Souza¹, José Antônio Poli de Figueiredo²

¹ Warwick Dentistry, Warwick Medical School, Warwick, United Kingdom

² School of Dentistry, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, PUCRS,
Porto Alegre, RS, Brazil

Address to correspondence: José Antonio Poli de Figueiredo. Post-Graduate Program in Dentistry - Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul – PUCRS. Av. Ipiranga 6681 Prédio 6 sala 507. CEP 90619-900 Porto Alegre - RS – Brazil. Telephone: +55 51 3320 3500 ext. 4307.

ABSTRACT

Purpose: Evaluate the bovine pulp tissue dissolution ability of photodynamic therapy.

Methods: Twenty pieces of bovine pulp tissue were weighed and divided randomly into four groups (n = 5), according to the cleaning protocol: G1 - distilled water (negative control), G2 - sodium hypochlorite 1% (positive control), G3 - photodynamic therapy, G4 - sodium hypochlorite 1% + photodynamic therapy. The observation of the events of dissolution was performed by two observers blinded in relation to the test using 2x loupe magnification, recording time in minutes until complete tissue dissolution. The total observation time was 2 hours. The dissolution rate was calculated dividing the weight of the fragment pulp (mg) by the time of dissolution (mg / min).

Results: only group 2 (NaOCl) was able to promote complete dissolution of pulp tissue. In the other groups there was no occurrence of complete dissolution of the samples. The mean dissolution time for samples from group 2 (NaOCl) was 1.26 mg / min.

Conclusion: photodynamic therapy was not able to dissolve the fragments of bovine pulp tissue and was not able to accelerate the rate of dissolution.

Key-words: pulp dissolution, sodium hypochlorite, photodynamic therapy.

RESUMO

Objetivo: Avaliar a capacidade de dissolução de tecido pulpar bovino com o uso da terapia fotodinâmica.

Metodologia: Vinte fragmentos de polpas bovinas foram pesados e distribuídos randomicamente em quatro grupos (n=5) de acordo com os seguintes protocolos de limpeza: G1 – água destilada (controle negativo), G2 – hipoclorito de sódio 1% (controle positivo), G3 – terapia fotodinâmica, G4 - hipoclorito de sódio 1% + terapia fotodinâmica. A observação dos eventos de dissolução foi realizada por dois observadores, cegados quanto aos grupos experimentais, com lupa de 2x de aumento, que registravam o tempo em minutos até a completa dissolução de tecido. O tempo total de observação foi de 2 horas. O cálculo da taxa de dissolução foi feito dividindo o peso do fragmento pelo tempo de dissolução (mg/min).

Resultados: somente o grupo 2 (NaOCl 1%) foi capaz de promover dissolução completa do tecido pulpar, tendo como média de dissolução 1.26 mg/min..

Conclusão: a terapia fotodinâmica não tem capacidade de dissolver tecido pulpar, nem de acelerar a velocidade de dissolução de tecido pulpar.

Palavras-chave: dissolução pulpar, hipoclorito de sódio, terapia fotodinâmica.

INTRODUCTION

The persistence of residual pulp tissue, infected dentin or bacteria inside the root canals may be responsible for the failure of endodontic treatment (1). Irrigating agents must present capacity of dissolving pulp remnants (2), since the removal of pulp tissue is inadequate with mechanical preparation alone, due to the complexities of the anatomical root canal system (3). Moreover, it is suggested that postoperative pain is more prevalent in cases of vital pulp than in cases of non-vital pulp (4) and the remaining pulp can cause postoperative pain (5).

Several studies have been conducted in search of an irrigant to provide four major properties: antimicrobial activity, non-toxicity to periapical tissues, solubility in water and ability to dissolve organic matter (6).

Sodium hypochlorite (NaOCl) is considered the main irrigating substance in endodontics because of its broad antimicrobial spectrum, its ability to prevent the formation and dissolving the organic part of the smear layer, and its ability to dissolve organic tissue remnants (2). However, it has been shown a cytotoxic effect on vital tissues, causing severe inflammatory reactions to the periapex, with the concentration of 5.25% producing more toxic and caustic solutions than 0.5 and 1% (7). Moreover, low concentrations of sodium hypochlorite have reduced the ability to dissolve tissue (8), although this can be improved by increasing the temperature (4,5).

Photodynamic therapy (PDT) or photoactivated disinfection uses light of a specific wavelength to activate a non-toxic photoactive dye, known as the photosensitizer in the presence of oxygen (9). The energy transferred from the activated photosensitizer to available oxygen results in the formation of highly reactive oxygen species, which may eliminate microorganisms by damaging their essential cellular molecules, including proteins, nucleic acids and lipid membranes (10). In vitro (11,12) and in vivo studies (13,14) using photodynamic therapy have shown that this resource has the potential to maximize the disinfection of root canals.

However, there are no studies reporting the capability of photodynamic therapy in the dissolution of organic tissue. The aim of this study was to evaluate the ability of the dissolution of bovine pulp tissue through the action of photodynamic therapy.

MATERIAL AND METHODS

The study was approved by the Ethics Committee of the Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (protocol 0024/10).

Tissue preparation

Ten bovine incisors were extracted, immersed in distilled water and stored at a temperature of -20°C until required. The teeth were thawed at room temperature and two longitudinal grooves were prepared in buccal and lingual surfaces using a diamond disc (KG Sorensen, Barueri, Brazil), running from the crown portion to the apex. The teeth were split in half. The pulp tissue was removed and washed with distilled water. Each pulp sample was divided into two pieces of similar volume, resulting in twenty pieces.

Preparation of solutions

Solution of 1% sodium hypochlorite was prepared at the Endodontic Laboratory, School of Dentistry, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, from the solution of 2% sodium hypochlorite (Plus Virex - Johnson Diversey, Sturtevant, USA) diluted in distilled water in the proportion 1:1. A viscous solution of toloum chloride was provided by the manufacturer of the photodynamic therapy device (PAD Plus, Denfotex Light Systems Ltd., Inverkeithing, Scotland).

Dissolution process

The pulp tissue fragments were weighed on a high precision balance (Sartorius BP61S, Göttingen, Germany), placed in transparent plastic pots and were divided randomly into four groups (n=5) according to initial weight:

Group 1 – immersion in 1.5 ml of distilled water (negative control).

Group 2 - immersion in 1.5 ml of 1% sodium hypochlorite (positive control).

Group 3 - immersion in 1.5 ml of toloum chloride, introduction of the tip of the PAD Plus (Denfotex Light Systems Ltd., Inverkeithing, Scotland) and activation of low power laser during a period of 120 seconds on the power of 120 mW.

Group 4 - immersion in 1.5 ml of 1% sodium hypochlorite for a period of 40 minutes, immersion in 1.5 ml of distilled water, removal of the pulp fragment and immersion again in 1.5 ml of toloum chloride, introduction of the tip of the PAD Plus

(Denfotex Light Systems Ltd., Inverkeithing, Scotland) and activation of low power laser during a period of 120 seconds on the power of 120 mW.

The observation of the events of dissolution was performed by two observers blinded in relation to the test using 2x loupes magnification, recording in minutes the time until complete tissue dissolution occurred. The total observation time was 2 hours. The time required for dissolution was recorded in minutes (min) and the dissolution rate was calculated by dividing the weight of the fragment pulp (mg) by the time of dissolution (mg / min).

RESULTS

Results were presented in a table with average weights and dissolution times. Since only one experimental group showed total dissolution, no further statistical analysis was needed.

The weight and time of dissolution of each pulp fragment are shown in Table 1. Only group 2 (NaOCl) was able to promote complete dissolution of pulp tissue. In the other groups there was no occurrence of complete dissolution of the samples.

The dissolution rate was calculated on the weight of the fragment of pulp tissue (mg) divided by the dissolution time (min), obtaining a value in mg / min. The mean dissolution time for samples from group 2 (NaOCl) was 1.26 mg / min.

DISCUSSION

Previous studies have demonstrated the importance of the ability of an endodontic solvent and emphasized that the elimination of pulp tissue of the root canal was primordial to the success of endodontic treatment (15,16). The bovine pulp tissue was used in our study because it is compared to human pulp tissue despite some minor differences (17). Moreover, previous studies have used the bovine pulp tissue to assess the capability of dissolving various endodontic irrigants (18,19).

As a larger volume of sodium hypochlorite and contact surface leads to a greater ability to dissolve (1,3) it can be speculated that the pots used in this experiment may have reduced the time of dissolution compared with the normal clinical conditions (in vivo), as it is most likely to occur according to previously reported in vitro investigations (4,18,19).

The tissue dissolution is dependent on three factors: frequency of agitation, amount of organic matter in relation to the amount of irrigating and surface area of contact (1). The present study was standardized by using the same volume of irrigant and dye for the samples of the respective groups, besides the fact that all samples of bovine pulp tissue fragments showed similar mean weights (+ - 90 mg).

The results were calculated in dissolution rates and not only time of dissolution, to compensate any variations in the weights of the fragments. The results of this study appear to be in line with previous investigations where only sodium hypochlorite showed ability to dissolve tissue (18,20), although in a previous study the average speed of tissue dissolution to sodium hypochlorite was lower (18). This can be explained by differences in the volume of irrigant in contact with the pulp fragment, specifically the size and weight of the fragments, the concentration of sodium hypochlorite solutions, and perhaps a difference in temperature of the solutions.

Photodynamic therapy is a new antimicrobial strategy that involves the use of low-intensity laser, which operates through photosensitizing agents (21). The low-intensity laser, beyond been considered harmless to human tissue, has anti-inflammatory and analgesic effects. Its basic mechanism of the operation is based on biostimulation that occurs at the molecular level. The laser penetrates through the tissues and faces a photosensitizer in mitochondria of cells (22).

Disinfection by photo-activation method proves effective against endodontic bacteria, and has proved less toxic and faster than sodium hypochlorite (23). Furthermore, the infiltration of dentin tubules by sensitizers was evaluated microscopically, indicating the effectiveness of this therapy within the tubules (11). There are still records that indicate oral bacteria as susceptible to photodynamic therapy (12).

However, there are no previous studies that elucidate the capacity of tissue dissolution of photodynamic therapy. The results of this study show that photodynamic therapy has not got potential to dissolve the fragments of bovine pulp tissue in the tested groups, both when used alone, with the dye in contact with the pulp fragment and light activation, and when used in combination with sodium hypochlorite, where after immersion in 1% sodium hypochlorite the fragment was placed in contact with the dye and activated through photodynamic therapy.

The idea was that photodynamic therapy could exert an ability to dissolve in a previously unstructured tissue by initial action provided by previous immersion in sodium hypochlorite. However, this could not be observed, since the dissolution process was interrupted from the laser action, without such a development.

CONCLUSION

In conclusion, only the sodium hypochlorite showed ability to dissolve the fragments of bovine pulp tissue and photodynamic therapy does not aid to provide further dissolution.

REFERENCES

1. Moorer WR, Wesselink PR. Factors promoting the tissue dissolving capability of sodium hypochlorite. *Int Endod J* 1982;15:187-196.
2. Zehnder. Root canal irrigants. *J Endod* 2006;32:389-398.
3. Thé SD. The solvent action of sodium hypochlorite on fixed and unfixed necrotic tissue. *J Endod* 1979;47:558-561.
4. Abou-Rass M, Oglesby SW. The effects of temperature, concentration and tissue type on the solvent ability of sodium hypochlorite. *J Endod* 1981;7:376-377.
5. Cunningham WT, Balekjian BA. Effect of temperature on collagen-dissolving ability of sodium hypochlorite irrigant. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1980;49:175-177.
6. Kuruvilla JR, Kamath MP. Antimicrobial activity of 2.5% sodium hypochlorite and 0.2% chlorhexidine gluconate separately and combined as endodontic irrigants. *J Endod* 1998;24:472-476.
7. Pashley EL, Birdsong NL, Bowman K, Pashley DH. Cytotoxic effect of NaOCl on vital tissue. *J Endod* 1985;11:525-528.
8. Hand RE, Smith ML, Harrison JW. Analysis of the effect of dilution on the necrotic tissue dissolution property of sodium hypochlorite. *J Endod* 1978;4:60-64.

9. Souza LC, Brito PRR, Oliveira JCM, Alves FRF, Moreira E JL, Sampaio-Filho HR et al. Photodynamic therapy with two different photosensitizers as a supplement to instrumentation/irrigation procedures in promoting intracanal reduction of *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 2010;2:292-296.
10. Konopka K, Goslinski T. Photodynamic therapy in dentistry. *J Dent Res* 2007;86:694-707.
11. Soukos NS, Chen PS, Morris JT, Ruggiero K, Albernethy AD, Som S, Foschi D et al. Photodynamic therapy for endodontic disinfection. *J Endod* 2006;32:979-984.
12. Fimple JL, Fontana CR, Foschi F, Ruggiero K, Song X, Pagonis TC et al. Photodynamic treatment of endodontic polymicrobial infection in vitro. *J Endod* 2008;34:728-734.
13. Garcez AS, Nunez SC, Hamblin MR, Ribeiro MS. Antimicrobial effects of photodynamic therapy on patients with necrotic pulps and periapical lesion. *J Endod* 2008;34:138-142.
14. Bonsor SJ, Nichol R, Reid TM. Microbiological evaluation of photo-activated disinfection in endodontics (an in vivo study). *Br Dent J* 2006;200:337-341.
15. Callahan JR. Sulfuric acid for opening root canals. *Dent Cos* 1894;36:957-959.
16. Grossman LI, Meiman B. Solution of pulp tissue by chemical agents. *J Am Dent Assoc* 1941;28:223-225.
17. Koskinen KP, Stenvall H, Uitto VJ. Dissolution of bovine pulp tissue by endodontic irrigants. *Scan J Dent Res* 1980;88:406-411.
18. Okino LA, Siqueira EL, Santos M, Bombana AC, Figueiredo JAP. Dissolution of pulp tissue by aqueous solution of chlorhexidine digluconate and chlorhexidine digluconate gel. *Int Endod J* 2004;37:38-41.
19. Rossi-Fedele G, Figueiredo JAP. Use of a bottle warmer to increase 4% sodium hypochlorite dissolution on bovine pulp. *Aust Endod J* 2008;34:39-42.

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

21. Garcez AS, Núñez SC, Lage-Marques JL, Jorge AOC, Ribeiro MS. Efficiency of NaOCl and laser-assisted photosensitization on the reduction of *Enterococcus faecalis* in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;102:93-98.

22. Eduardo CP, Gouw-Soares S. The use of lasers for endodontic applications in dentistry. *Med Laser Appl* 2001;16:231-243.

23. Bonsor SJ, Nichol R, Reid TMS, Pearson GJ. An alternative regimen for root canal disinfection. *Br Dent J* 2006 Jul; 201: 101-105.

Table 1 – Weight and time dissolution of dissolution of each pulp tissue sample

	Sample 1		Sample 2		Sample 3		Sample 4		Sample 5	
Group	Weight (mg)	Time (min)	Weight (mg)	Time (min)	Weight (mg)	Time (min)	Weight (mg)	Time (min)	Weight (mg)	Time (min)
1	99,7	nildiss	138,7	nildiss	71,7	nildiss	69,7	nildiss	83,0	nildiss
2	67,8	55	140,2	90	83,2	75	102,1	85	79,3	70
3	66,8	nildiss	109,4	nildiss	108,2	nildiss	72,8	nildiss	102,2	nildiss
4	123,3	nildiss	145,7	nildiss	52,5	nildiss	49,5	nildiss	52,7	nildiss

4 DISCUSSÃO GERAL

O sucesso do tratamento endodôntico está relacionado, entre outros fatores, a uma eficiente descontaminação e à dissolução de matéria orgânica do interior do sistema de canais radiculares. Para tal, dispomos de substâncias químicas auxiliares e recursos alternativos que desempenham suas funções concomitantemente à ação mecânica dos instrumentos endodônticos.

Diversos estudos têm sido conduzidos na endodontia em busca de um protocolo de limpeza que atinja tais propriedades. O presente estudo, através da realização de dois artigos científicos, procurou avaliar essas duas variáveis tão relevantes na realização do tratamento endodôntico.

O primeiro artigo teve como objetivo comparar, *in vitro*, a ação da terapia fotodinâmica com a ação do hipoclorito de sódio em canais radiculares infectados com *Enterococcus faecalis*, analisando o potencial de descontaminação nas paredes dentinárias e no sistema de túbulos dentinários.

As amostras foram contaminadas com *Enterococcus faecalis*, por se tratar de um microorganismo anaeróbio facultativo altamente resistente (ROÇAS *et al.*, 2004), que vem sendo amplamente utilizado como marcador microbiológico para estudos *in vitro*. Isso se deve ao fato dele demonstrar ser capaz de colonizar com sucesso o canal radicular em forma de biofilme, bem como invadir túbulos dentinários e resistir a alguns procedimentos de descontaminação do sistema de canais radiculares (LOVE, 2001; SEDGLEY *et al.*, 2005; GEORGE *et al.*, 2005).

O tempo de contaminação das amostras é um fator bastante variável na literatura. Esse período varia em estudos prévios de 24 horas (SIQUEIRA JR. *et al.*, 2000; GARCEZ *et al.*, 2006) a 21 dias (BERBER *et al.*, 2006). No entanto, o presente estudo realizou a contaminação pelo período de 60 dias, de forma semelhante a estudo anterior (GURGEL-FILHO *et al.*, 2007). Acredita-se que um período mais prolongado de contaminação e proliferação de *Enterococcus faecalis* seja necessário para que haja a formação de um biofilme mais consistente e organizado, permitindo uma adequada colonização. Dessa forma, os protocolos de descontaminação estariam sendo efetivamente testados.

Neste experimento foram utilizados dentes humanos extraídos, diferentemente de estudos anteriores onde foi utilizado um modelo de dentes bovinos (GOMES *et al.*,

2003; KRAUSE *et al.*, 2007). Apesar da semelhança em relação à quantidade, morfologia e densidade em ambos os modelos, os túbulos dentinários nos dentes humanos são menores se comparados aos dentes bovinos. E, assim sendo, o presente estudo simula de forma adequada as reais condições clínicas e anatômicas encontradas no sistema de canais radiculares.

O preparo do canal radicular pode ser realizado de modo prévio à inoculação (GARCEZ *et al.*, 2006; BERGMANS *et al.*, 2008; MEIRE *et al.*, 2009), utilizando uma substância química auxiliar inerte. Por outro lado, pode ser realizado posteriormente à inoculação, em conjunto com as substâncias químicas auxiliares e recursos de descontaminação utilizados (DAMETTO *et al.*, 2005; BERBER *et al.*, 2006; SOUZA *et al.*, 2010), caracterizando o preparo químico-mecânico. No presente estudo, o preparo do canal radicular foi realizado previamente à inoculação com *Enterococcus faecalis*, realizando a ampliação até a lima 60. Foi executado dessa forma para avaliar o real efeito dos protocolos de descontaminação, obtendo o potencial intrínseco dos mesmos. Além disso, serve para propiciar espaço para realização da inoculação, uma vez que os canais dos pré-molares inferiores são mais constrictos, e para adequada penetração e adaptação da ponta do aparelho do laser.

A microscopia eletrônica de varredura (MEV), através da aquisição de imagens em BS nos aumentos de 5.000x para luz do canal e 10.000x para interface dentinária, foi o critério utilizado para avaliar o efeito dos tratamentos propostos no estudo. É uma forma diferente da utilizada por muitos estudos, onde amostras são coletadas do interior do canal radicular, plaqueadas e, após a cultura, é realizada a contagem das unidades formadoras de colônias (GARCEZ *et al.*, 2006; BERGMANS *et al.*, 2008; MEIRE *et al.*, 2009; SOUZA *et al.*, 2010). Entende-se que, em muitos casos, o insucesso do tratamento endodôntico ocorre devido à permanência de bactérias em áreas inacessíveis ao preparo químico-mecânico. Desse modo, a utilização desse método de avaliação permite uma melhor visualização dos microorganismos remanescentes nessas áreas, verificando se os protocolos testados são realmente eficazes não somente na luz do canal, mas também na profundidade de penetração nos túbulos dentinários, uma vez que as imagens permitem a visualização da área de interface dentinária.

Os resultados do presente estudo mostraram que o grupo hipoclorito de sódio 2,5% + terapia fotodinâmica apresentou a maior média de ranqueamento de posições dos grupos testados nos terços apical, médio e cervical, ao nível da luz do canal e interface

dentinária. Mesmo nas ocasiões em que não houve diferença estatisticamente significativa na comparação entre os grupos com resultados semelhantes, a média de ranqueamento deste grupo era a maior dentre eles. Isso significa dizer que foi o grupo que apresentou uma maior eficácia na eliminação do *Enterococcus faecalis* do interior do sistema de canais radiculares. Resultados semelhantes foram encontrados em estudo prévio (SOUZA *et al.*, 2010), onde foi avaliado o efeito antimicrobiano da terapia fotodinâmica como suplemento do preparo do canal radicular utilizando hipoclorito de sódio 2,5% como substância química auxiliar. Os grupos onde foi realizada a associação foram mais efetivos na eliminação de *Enterococcus faecalis*. Isso pode ser explicado pela elevada capacidade antimicrobiana do hipoclorito de sódio e pelo direcionamento do feixe de laser através dos túbulos dentinários, permitindo um maior potencial de descontaminação tanto na luz do canal quanto na interface dentinária.

Resultados semelhantes aos do presente estudo também foram encontrados em estudo anterior (MEIRE *et al.*, 2009), onde avaliando o uso isolado do hipoclorito de sódio 2,5% e da terapia fotodinâmica, foi constatado que estes protocolos de descontaminação apresentaram resultados superiores aos grupos controles, sem diferença estatisticamente significativa entre si. Da mesma forma como no presente estudo, apesar de não haver essa diferença, os grupos onde foi utilizado hipoclorito de sódio 2,5% como protocolo de descontaminação apresentaram os maiores valores de descontaminação nas amostras inoculadas com *Enterococcus faecalis*.

Os melhores resultados para a associação de hipoclorito de sódio 2,5% e PAD ocorreu no terço apical. Possivelmente, o fato da fonte de luz ter sido colocada a 2 mm aquém do comprimento de trabalho pode ter influenciado estes resultados. É possível especular que exposições similares com a fonte de luz possam contemplar os terços médio e cervical. Embora aumentasse o tempo do processo, seria uma opção considerando os resultados encontrados no terço apical.

Isoladamente, a terapia fotodinâmica apresentou resultados inferiores no que diz respeito ao processo de descontaminação das amostras inoculadas com *Enterococcus faecalis* quando comparada ao hipoclorito de sódio 2,5% e à associação hipoclorito de sódio 2,5% + terapia fotodinâmica, segundo os resultados do presente estudo. Tais achados são contrários aos encontrados por estudo prévio (GARCEZ *et al.*, 2006), onde avaliando a ação da terapia fotodinâmica na redução de *Enterococcus faecalis* foram encontrados resultados superiores aos proporcionados pela ação de uma solução de

hipoclorito de sódio. Isso pode ser explicado pela baixa concentração de hipoclorito de sódio utilizada no estudo, que foi de 0,5%. Ainda assim, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Nos grupos onde foi utilizado PAD isoladamente ou após o uso do hipoclorito de sódio, podem ser encontradas imagens de *Enterococcus faecalis* com ruptura de membranas e espaços vazios. Os vazios parecem sugerir que, em alguns casos, o PAD atua parcialmente, possivelmente onde o fotossensibilizador e/ou a fonte de luz não atingiu completamente a área.

O segundo artigo teve como objetivo avaliar a capacidade de dissolução do tecido pulpar bovino através da ação da terapia fotodinâmica.

O tecido pulpar bovino foi utilizado no presente estudo porque é comparado ao tecido pulpar humano (KOSKINEN *et al.*, 1980). Além disso, estudos prévios têm utilizado o tecido pulpar bovino para avaliar a capacidade de dissolução de diferentes irrigantes endodônticos (OKINO *et al.*, 2004; ROSSI-FEDELE & FIGUEIREDO, 2008).

A dissolução tecidual é dependente de três fatores: frequência de agitação, quantidade de matéria orgânica em relação à quantidade de irrigante e a área de superfície de contato (MOORER & WESSELINK, 1982). Neste estudo foi padronizado o mesmo volume de irrigante e corante para as amostras dos respectivos grupos, além do fato de todas as amostras de fragmentos de tecido pulpar bovino apresentarem um peso similar (+/- 90 mg).

Os resultados foram descritos em velocidade de dissolução e não em tempo de dissolução, para compensar a variação nos pesos dos fragmentos. Os resultados deste estudo parecem estar em linha com investigações prévias onde somente o hipoclorito de sódio apresentou capacidade de dissolução tecidual (OKINO *et al.*, 2004; NAENNI *et al.*, 2004), embora em um estudo prévio a média da velocidade de dissolução tecidual para o hipoclorito de sódio tenha sido menor (OKINO *et al.*, 2004). Isso pode ser explicado pelas diferenças no volume de irrigante em contato com o fragmento pulpar, especificamente o tamanho e o peso dos fragmentos, a concentração das soluções de hipoclorito de sódio e, ainda, uma diferença na temperatura das soluções.

Os resultados do presente estudo mostraram que a terapia fotodinâmica não apresentou potencial para dissolver os fragmentos de tecido pulpar bovino nos grupos em que foi testada. Isso foi observado quando utilizada isoladamente, estando o corante

em contato com o fragmento pulpar e realizado o acionamento do laser de baixa de intensidade, e quando utilizada em associação com o hipoclorito de sódio, onde após a imersão no agente irrigante o fragmento foi colocado em contato com o corante e, da mesma, forma realizado o acionamento do laser de baixa intensidade. A hipótese era que a terapia fotodinâmica pudesse exercer a capacidade de dissolução em um tecido previamente desestruturado pela ação inicial proporcionada pela imersão em hipoclorito de sódio previamente. No entanto, isso não pôde ser observado, uma vez que o processo de dissolução foi interrompido a partir da ação do laser, não se observando uma evolução do mesmo.

Clinicamente, diante dos resultados obtidos, a presente dissertação sugere a utilização da terapia fotodinâmica como um complemento antimicrobiano ao preparo químico-mecânico realizado com hipoclorito de sódio como substância química auxiliar, não sendo recomendado no intuito de contribuir com o processo de dissolução de matéria orgânica. Além da ação química da substância química auxiliar e ação mecânica dos instrumentos endodônticos, haveria um recurso adicional capaz de alcançar áreas de difícil de acesso do sistema de canais radiculares. Dessa forma, temos um recurso eficiente na eliminação dos microorganismos que resistem aos tradicionais procedimentos intra-canais de descontaminação, como é o caso do *Enterococcus faecalis*.

Diante do exposto, é possível concluir que a terapia fotodinâmica contribuiu para a eliminação de *Enterococcus faecalis*, tendo um resultado mais significativo quando utilizada como um complemento à ação química do hipoclorito de sódio. Além disso, pode-se concluir que a terapia fotodinâmica não apresentou uma capacidade de dissolução tecidual.

5 REFERÊNCIAS

1. Abou-Rass M, Jastrab J. The use of rotatory instruments as auxiliary aids to root canal preparation molars. *J Endod* 1992;8(1):78-82.
2. Bahcall J, Howard P, Miserendino L, Walia H. Preliminary investigation of the histological effects of laser endodontic treatment on the periradicular tissues in dogs. *J Endod* 1992;18:47-51.
3. Berber VB, Gomes BP, Sena NT, Vianna ME, Ferraz CC, Zaia AA et al. Efficacy of various concentrations of NaOCl and instrumentation techniques in reducing *Enterococcus faecalis* within root canals and dentinal tubules. *Int Endod J* 2006;39(1):10-17.
4. Bergmans L, Moisiadis P, Huybrechts B, Van Meerbeek B, Quirynen M, Lambrecht P. Effect of photo-activated disinfection on endodontic pathogens ex vivo. *Int Endod J* 2008;41:227-239.
5. Bloomfield SF, Miles GA. The antibacterial properties of sodium dichloroisocyanurate and sodium hypochlorite formulations. *J Appl Bacteriol* 1979;46(1):65-73.
6. Buck RA, Eleazer PD, Staat RH, Scheetz JP. Effectiveness of three endodontic irrigants at various tubular depths in human dentin. *J Endod* 2001;27: 206–208.
7. Chang YC, Huang FM, Tai KW, Chou MY. The effect of sodium hypochlorite and chlorhexidine on cultured human periodontal ligament cells. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001;92:446–50.
8. Cecchin D, Farina AP, Barbizam JVB, Paranhos MPG, Carlini Júnior B. Effects of endodontic irrigants solutions on the adhesive bond strength to dentin. *Braz Dent J* No prelo 2009.
9. Demidova TN, Hamblin MR. Photodynamic therapy targeted to pathogens. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2004;17:245–254.

10. Dametto FR, Ferraz CCR, Gomes BPF, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. 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 Endod* 2005;99:768-772.
11. Dunavant TR, Regan JD, Glickman GN, Solomon ES, Honeyman AL. Comparative evaluation of endodontic irrigants against *Enterococcus faecalis* biofilms. *J Endod* 2006;32(6):527-531.
12. Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *Int Endod J* 2002;35:221-228.
13. Ferraz CCR, Gomes BPF, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. In vitro assessment of the antimicrobial action and the mechanical ability of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant. *J Endod* 2001;27:452-455.
14. Figdor D, Davies JK, Sundqvist G. Starvation survival, growth and recovery of *Enterococcus faecalis* in human serum. *Oral Microbiol Immunol* 2003;18(4):234-239.
15. Figdor D. Microbial aetiology of endodontic treatment failure and pathogenic properties of selected species. *Aust Endod J* 2004;30:11-14.
16. Garcez AS, Núñez SC, Lage-Marques JL, Jorge AOC, Ribeiro MS. Efficiency of NaOCl and laser-assisted photosensitization on the reduction of *Enterococcus faecalis* in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;102:93-98.
17. George S, Kishen A, Song KP. The role of environmental changes on monospecies biofilm formation on root canal wall by *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 2005;31:867-72.
18. Gomes BPF, Souza SFC, Ferraz CCR, Teixeira FB, Zaia AA, Valdrighi L, Souza-Filho FJ. Effectiveness of 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis* in bovine root dentine in vitro. *Int Endod J* 2003;36:267-275.

19. Gurgel-Filho ED, Vivacqua-Gomes N, Gomes BPF, Ferraz CCR, Zaia AA, Souza-Filho FJ. *In vitro* evaluation of the effectiveness of the chemomechanical preparation against *Enterococcus faecalis* after single- or multiple-visit root canal treatment. *Braz Oral Res* 2007;21:308-313.
20. Haapasalo M. Bacteroides spp in dental root canal infections. *Endod Dent Traumatol* 1989;5:1-10.
21. Hamblin MR, Hasan T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem Photobiol Sci* 2004;3:436-450.
22. Hardee MW, Miserendino L, Kos W, Walia H. Evaluation of the antibacterial effects of intracanal Nd:YAG laser irradiation. *J Endod* 1994;20:377-380.
23. Izu KH, Thomas SJ, Zhang P, Izu AE, Michalek S. Effectiveness of sodium hypochlorite in preventing inoculation of periapical tissues with contaminated patency files. *J Endod* 2004;30:92-94.
24. Jeanson MJ, White RR. A comparison of 2.0% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite as antimicrobial endodontic irrigants. *J Endod* 1994;20(6):276-278.
25. Jett BD, Huycke MM, Gilmore MS. Virulence of Enterococci. *Clin Microbiol Rev* 1994;7:462-478.
26. Kimura Y, Wilder-Smith P. Lasers in endodontic: a review. *Int Endod J* 2000;33:173-185.
27. Koskinen KP *et al.* Dissolution of bovine pulp tissue by endodontic solutions. *Scand J Dent Res* 1980;88(5):406-411.
28. Krause TA, Liewehr FR, Hahn CL. The antimicrobial effect of MTAD, sodium hypochlorite, doxycycline, and citric acid on *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 2007;33:28-30.
29. Kuruvilla JR, Kamath MP. Antimicrobial activity of 2.5% sodium hypochlorite and 0.2% chlorhexidine gluconate separately and combined as endodontic irrigants. *J Endod* 1998;24:472-476.

30. Lee W, Lim S, Son H, Bae K. Sonicated extract of *Enterococcus faecalis* induces irreversible cell cycle arrest in phytohemagglutinin-activated human lymphocytes. *J Endod* 2004;30:209–212.
31. Lim Z, Cheng JL, Lim TW. Light activated disinfection: an alternative endodontic disinfection strategy. *Aust Dent J* 2009;54:108–114.
32. Love RM. *Enterococcus faecalis* – a mechanism for its role in endodontic failure. *Int Endod J* 2001;34:399–405.
33. Meire MA, De Prijcks K, Coenye T, Nelis HJ, De Moor JG. Effectiveness of different laser systems to kill *Enterococcus faecalis* in aqueous suspension and in an infected tooth model. *Int Endod J* 2009;42:351-359.
34. Molander A, Reit C, Dahlén G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with periapical periodontitis. *Int Endod J* 1998;31:1-7.
35. Moorer WR, Wesselink PR. Factors promoting the tissue dissolving capability of sodium hypochlorite. *Int Endod J* 1982;15:187-196.
36. Naenni N, Thoma K, Zehnder M. Soft tissue dissolution capacity of currently used and potential irrigants. *J Endod* 2004;30:785-787.
37. Odor TM, Watson TF, Pitt Ford TR, McDonald F. Pattern of transmission of laser light in teeth. *Int Endod J* 1996;29:228-234.
38. Okino LA, Siqueira EL, Santos M, Bombana AC, Figueiredo JA. Dissolution of pulp tissue by aqueous solution of chlorhexidine digluconate and chlorhexidine digluconate gel. *Int Endod J* 2004;37(1):38-41.
39. Pinheiro ET, Gomes BPFA, Ferraz CCR, Sousa ELR, Teixeira FB, Souza Filho FJ. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J*. 2003;36:1–11.
40. Rôças IN, Siqueira JF, Santos KRN. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod* 2004;30:315–320.

41. Rossi-Fedele G, Figueiredo JAP. Use of a bottle warmer to increase 4% sodium hypochlorite dissolution on bovine pulp. *Aust Endod J* 2008;34:39-42.
42. Safavi KE, Spangberg LS, Langeland K. Root canal dentinal tubule disinfection. *J Endod* 1990;16:207-210.
43. Sedgley CM, Lennan SL, Appelbe OK. Survival of *Enterococcus faecalis* in root canals ex vivo. *Int Endod J* 2005;38:735–742.
44. Siqueira JF, Machado AG, Silveira RM, Lopes HP, Uzeda M. Evaluation of the effectiveness of sodium hypochlorite used with three irrigation methods in the elimination of *Enterococcus faecalis* from the root canal, in vitro. *Int Endod J* 1997;30(4):279-282.
45. Siqueira-Jr JF, Rôças IN, Favieri A, Lima KC. Chemomechanical reduction of the bacterial population in the root canal after instrumentation and irrigation with 1%, 2.5%, and 5.25% sodium hypochlorite. *J Endod* 2000;16:331-334.
46. Semenoff TADV, Ferreira WRS, Semenoff-Segundo A, Biasoli ER. In vitro effectiveness of Aloe vera in natura, 0.12% chlorhexidine gel, and 2% chlorhexidine gel against *Enterococcus faecalis*. *J Dent Sci* 2008;23:283-286.
47. Souza LC, Brito PRR, Oliveira JCM, Alves FRF, Moreira JL, Sampaio-Filho HR, et al. Photodynamic therapy with two different photosensitizers as a supplement to instrumentation/irrigation procedures in promoting intracanal reduction of *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 2010;36:292-296.
48. Sundqvist G. Bacteriological studies of necrotic dental pulps [dissertação]. Umea (Suécia): University of Umea; 1976.
49. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U. Microbiological analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative retreatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998;85:86-93.
50. Tendolkar PM, Baghdayan AS, Shankar N. Pathogenic *Enterococci*: new developments in the 21st century. *Cell Mol Life Sci* 2003;60:2622–2636.
51. Thé SD. The solvent action of sodium hypochlorite on fixed and unfixed necrotic tissue. *J Endod* 1979;47:558-561.

52. Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J Antimicrob Chemother* 1998;42:13–28.
53. Wilson M. Lethal photosensitization of oral bacteria and its potential application in the photodynamic therapy of oral infections, *Photochem Photobiol Sci* 2004;3:412– 418.
54. Zehnder M, Grawehr M, Hasselgren G, Waltimo T. Tissue-dissolution capacity and dentin-disinfecting potential of calcium hydroxide mixed with irrigating solutions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003;96:608–613.
55. Zehnder. Root canal irrigants. *J Endod* 2006;32:389-398.

6 ANEXOS

6.1 Anexo A

-----Mensagem original-----

De: ees.joe.0.e699b.8fcd135b@eesmail.elsevier.com

[mailto:ees.joe.0.e699b.8fcd135b@eesmail.elsevier.com]

Em nome de The Journal of Endodontics

Enviada em: segunda-feira, 10 de janeiro de 2011 09:04

Para: Jose Antonio P de Figueiredo

Assunto: Submission Confirmation for In vitro effect of photodynamic therapy and sodium hypochlorite on root canal system infected with Enterococcus faecalis

Dear Dr. Figueiredo,

Your submission entitled "In vitro effect of photodynamic therapy and sodium hypochlorite on root canal system infected with Enterococcus faecalis" has been received by the Journal of Endodontics.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to the Journal of Endodontics web site as an author.

The URL is <http://ees.elsevier.com/joe/>

Your username is: endofig

If you need to retrieve password details,

please go to: http://ees.elsevier.com/joe/automail_query.asp

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to the Journal of Endodontics.

Kind regards,

Journal of Endodontics

6.2 Anexo B

Dear Dr. Matheus Albino Souza,

Thank you for submitting the manuscript entitled "Analysis of bovine pulp tissue dissolution ability by photodynamic therapy - in vitro study" to the Revista Odonto Ciência (Journal of Dental Science). It has been successfully submitted online and is presently being given full consideration.

You can view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to the journal website using:

Manuscript URL:

<http://revistaseletronicas.pucrs.br/ojs/index.php/fo/author/submission/8220>

Username: matheus_souza_pf

If you have any questions, please contact us. Thank you for considering our journal to publish your work.

Sincerely,

Editorial Team

Revista Odonto Ciência (Journal of Dental Science)

<http://revistaseletronicas.pucrs.br/ojs/index.php/fo/index>

ISSN 0102-9460 (print)

ISSN 1980-6523 (online)

E-mail: odontociencia@pucrs.br

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

6.3 Anexo C



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

OF.CEP-1637/09

Porto Alegre, 04 de dezembro de 2009.


Senhor Pesquisador,

O Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa registro CEP 09/04883 intitulado **"Efeito *in vitro* da terapia fotodinâmica do hipoclorito de sódio e da clorexina sobre a parede dentinária infectada por *enterococcus faecalis*".**

Salientamos que seu estudo pode ser iniciado a partir desta data,

Os relatórios parciais e final deverão ser encaminhados a este CEP.

Atenciosamente,


Prof. Dr. José Roberto Goldim
Coordenador do CEP-PUCRS

Ilmo. Sr.
Prof. José Antônio Poli de Figueiredo
Faculdade de Odontologia
Nesta Universidade

PUCRS

Campus Central
Av. Spranga, 6690 - 3º andar - CEP: 90610-000
Sala 314 - Fone Fax: (51) 3320-3345
E-mail: cep@pucrs.br
www.pucrs.br/prppg/cep

7 APÊNDICES

7.1 Imagens MEV – grupo 1 (nenhum procedimento)

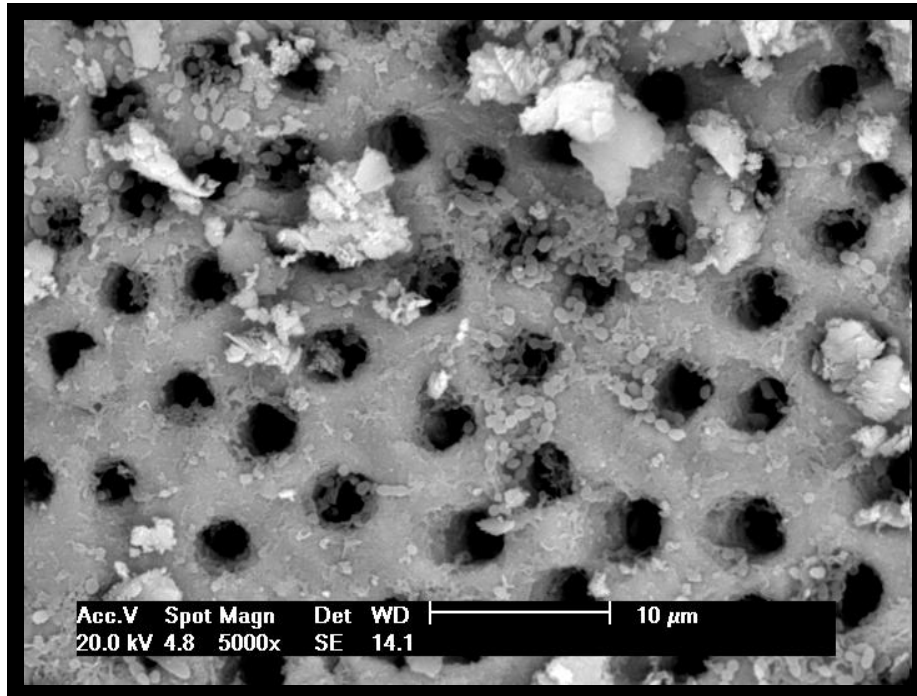


Figura 1 – magnificação de 5.000x no terço apical ao nível da luz do canal.

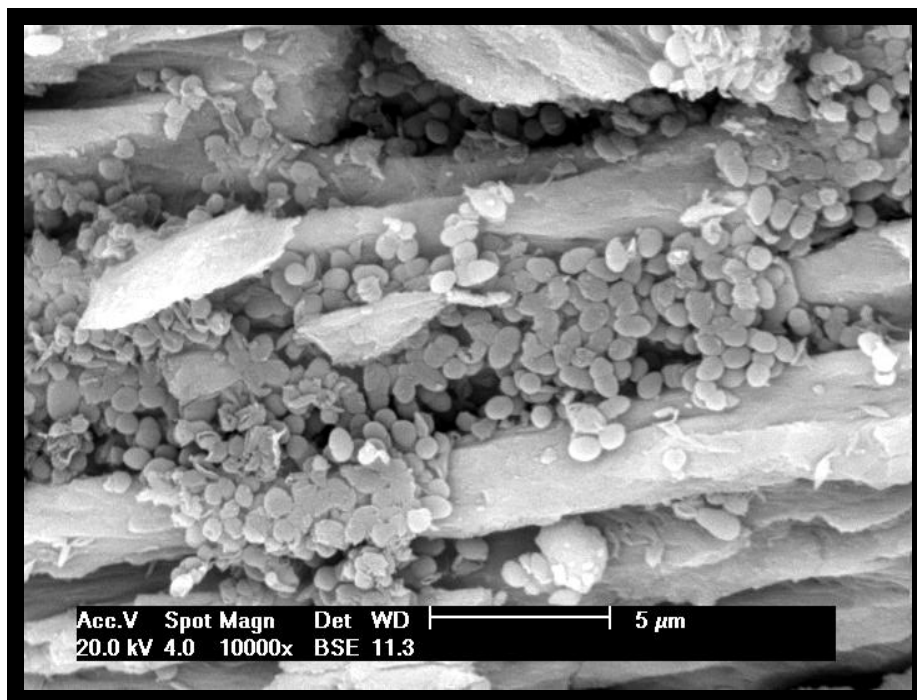


Figura 2 – magnificação de 10.000x no terço apical ao nível da interface dentinária.

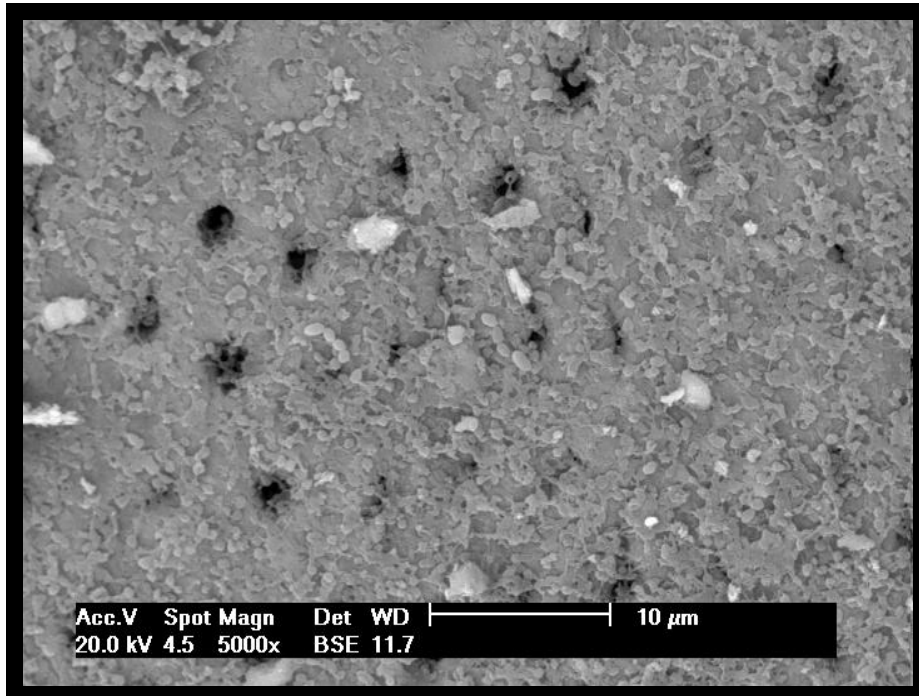


Figura 3 – magnificação de 5.000x no terço médio ao nível da luz do canal.

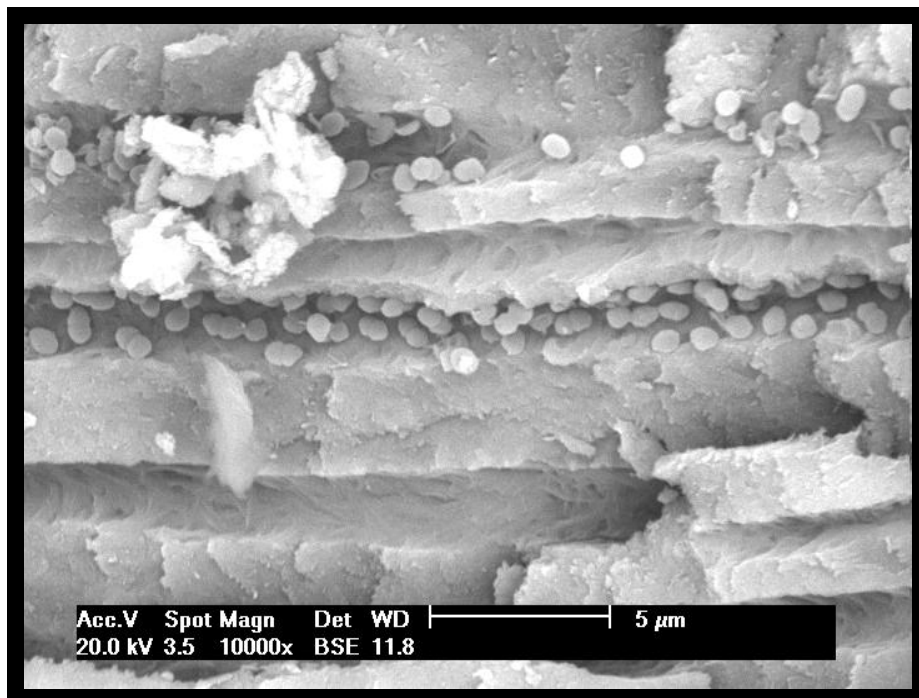


Figura 4 – magnificação de 10.000x no terço médio ao nível da interface dentinária.

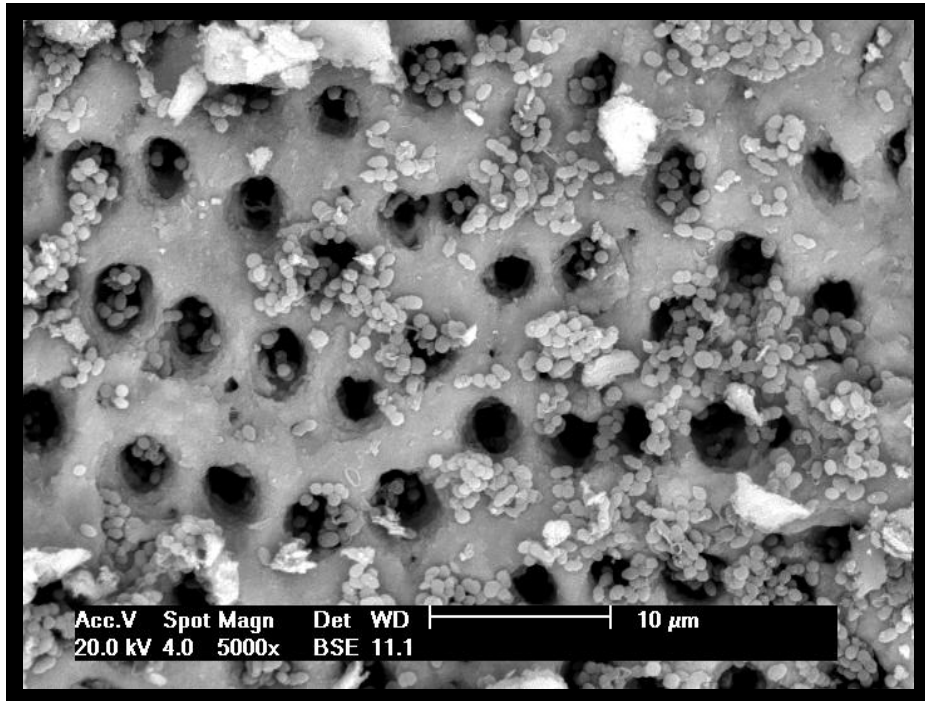


Figura 5 – magnificação de 5.000x no terço cervical ao nível da luz do canal.

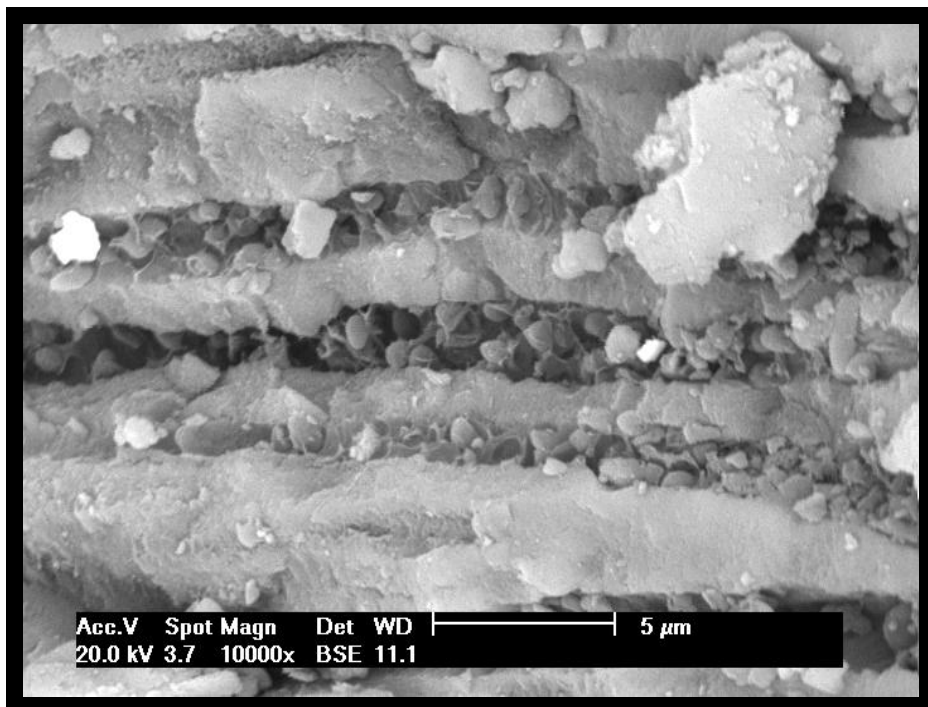


Figura 6 – magnificação de 10.000x no terço cervical ao nível da interface dentinária.

7.2 Imagens MEV – grupo 2 (água destilada)

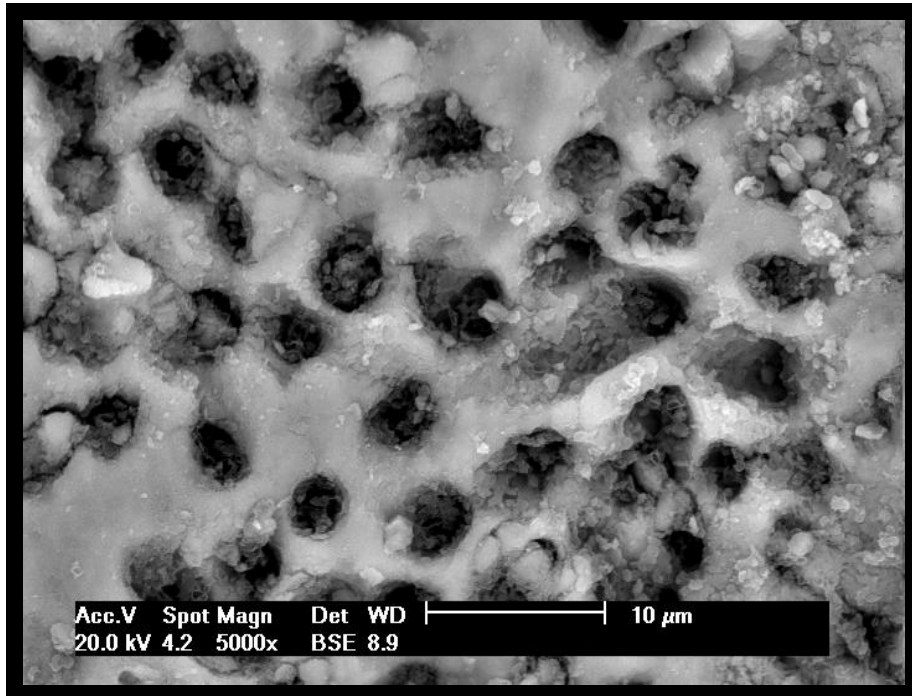


Figura 7 – magnificação de 5.000x no terço apical ao nível da luz do canal.

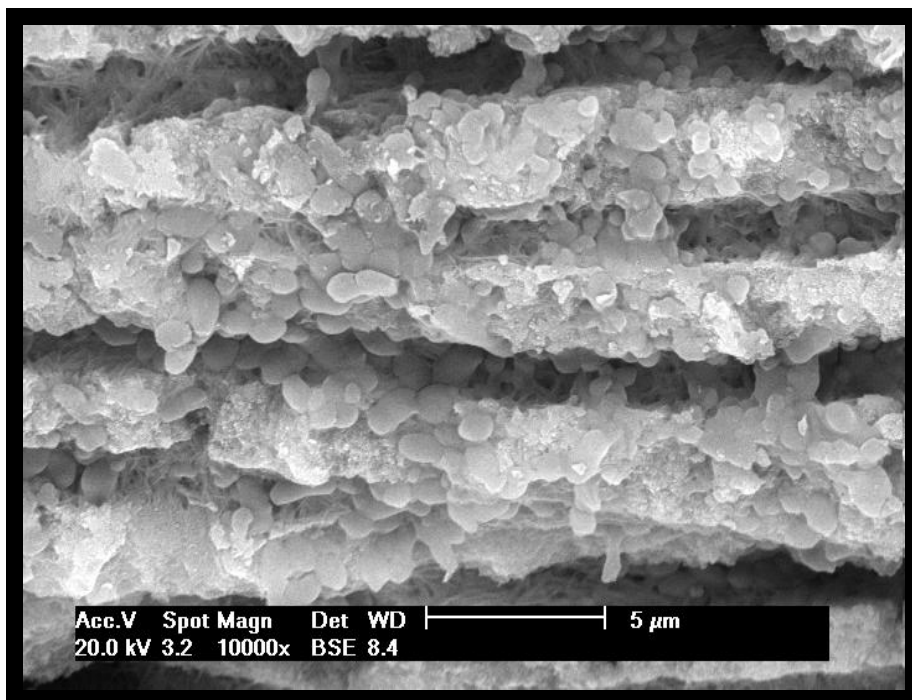


Figura 8 – magnificação de 10.000x no terço apical ao nível da interface dentinária.

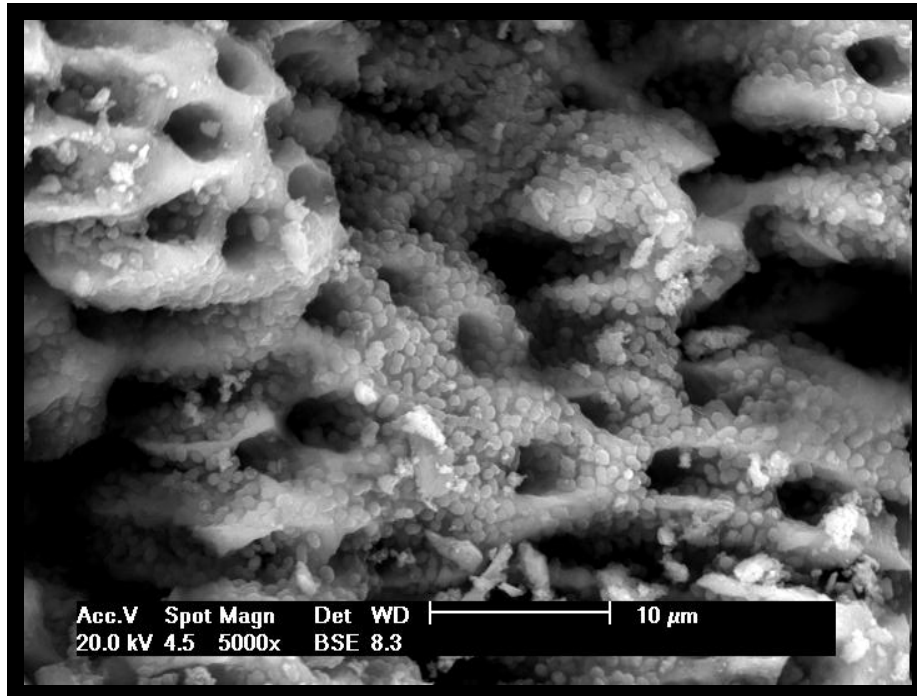


Figura 9 – magnificação de 5.000x no terço médio ao nível da luz do canal.

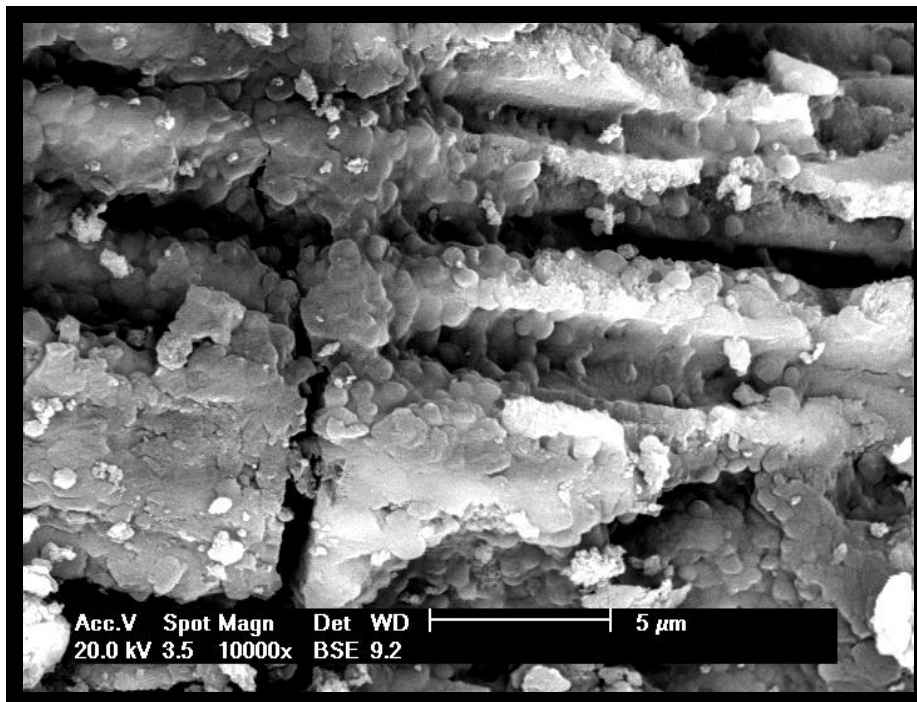


Figura 10 – magnificação de 10.000x no terço médio ao nível da interface dentinária.

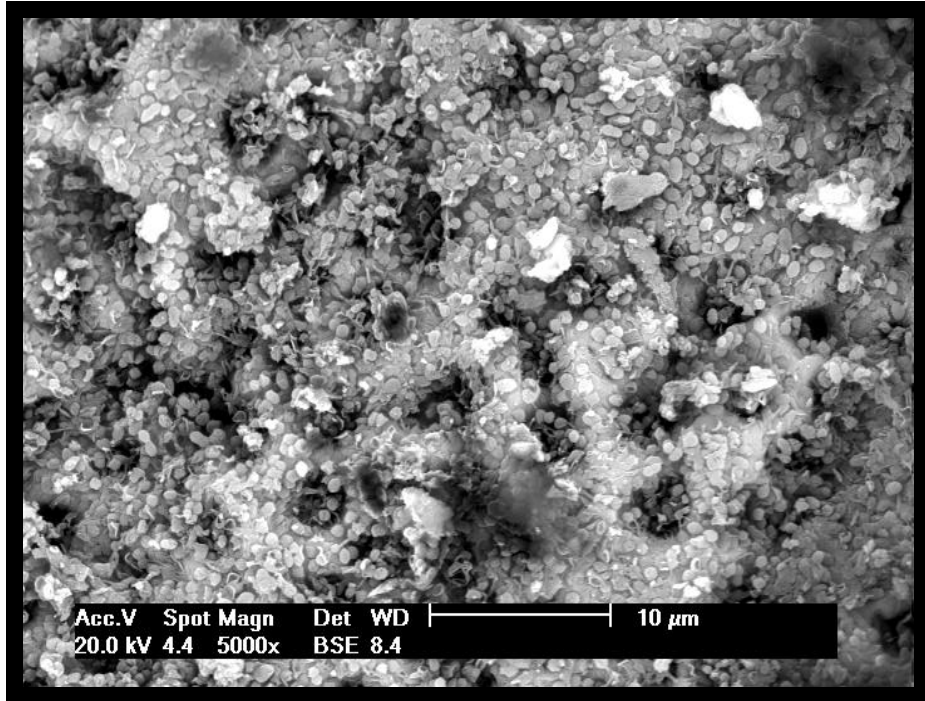


Figura 11 – magnificação de 5.000x no terço cervical ao nível da luz do canal.

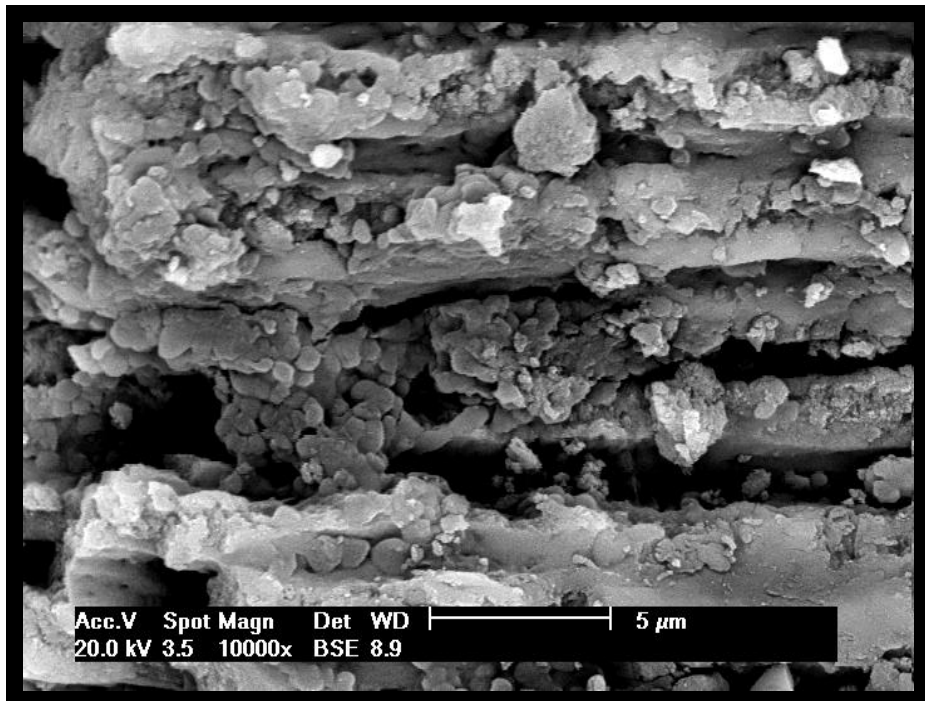


Figura 12 – magnificação de 10.000x no terço cervical ao nível da interface dentinária.

7.3 Imagens MEV – grupo 3 (terapia fotodinâmica)

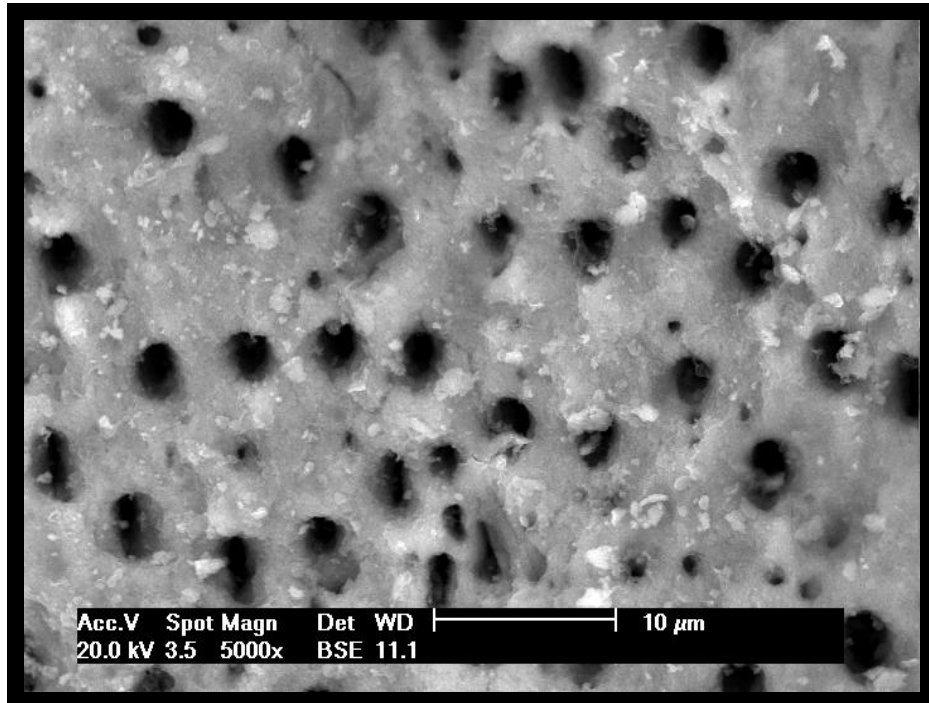


Figura 13 – magnificação de 5.000x no terço apical ao nível da luz do canal.

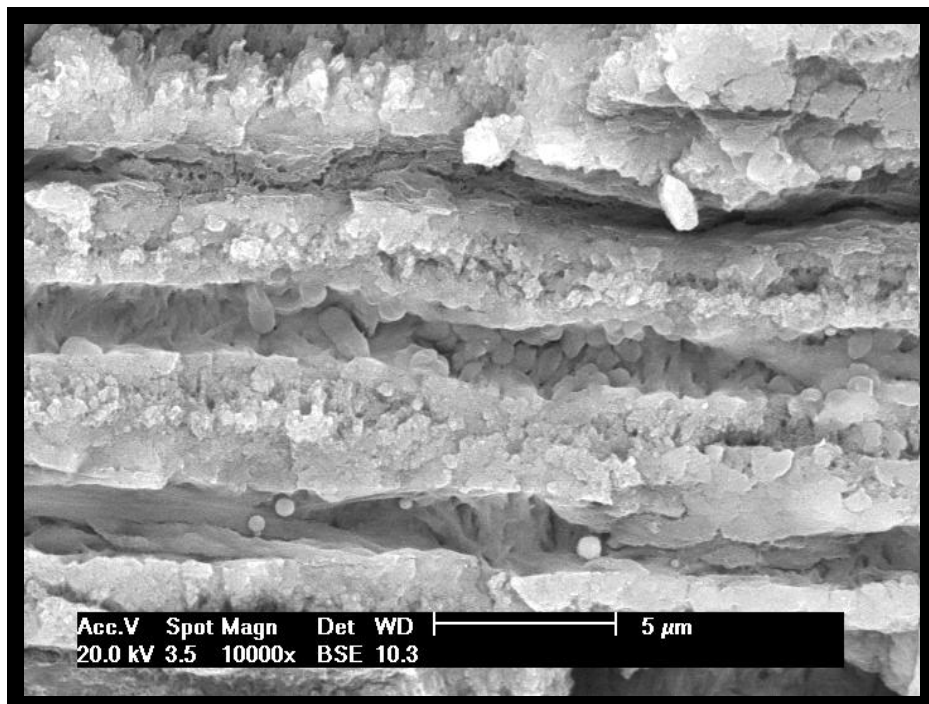


Figura 14 – magnificação de 10.000x no terço apical ao nível da interface dentinária.

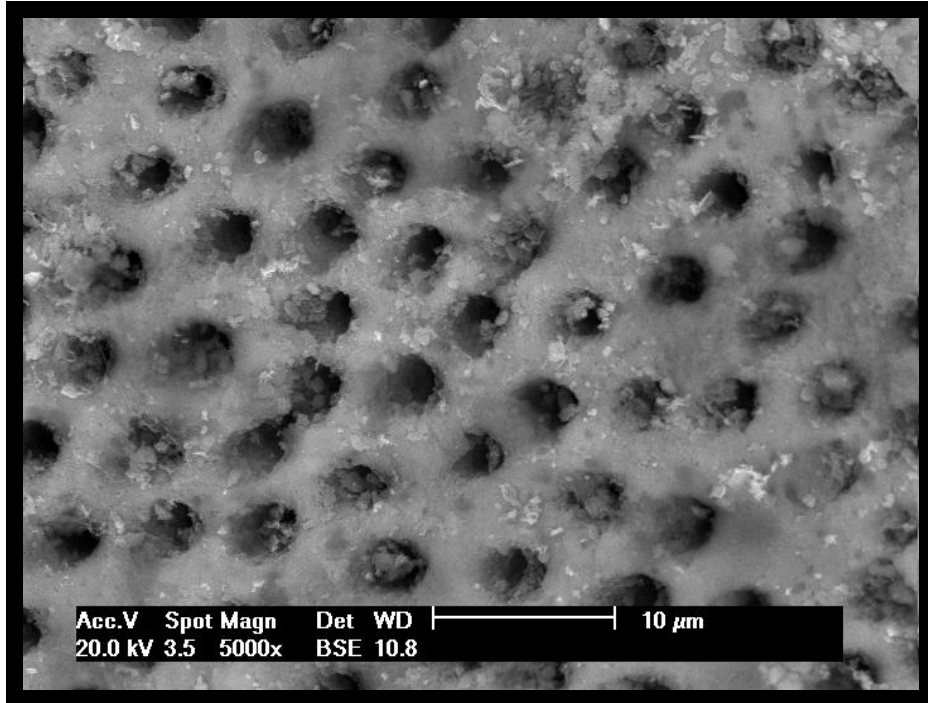


Figura 15 – magnificação de 5.000x no terço médio ao nível da luz do canal.

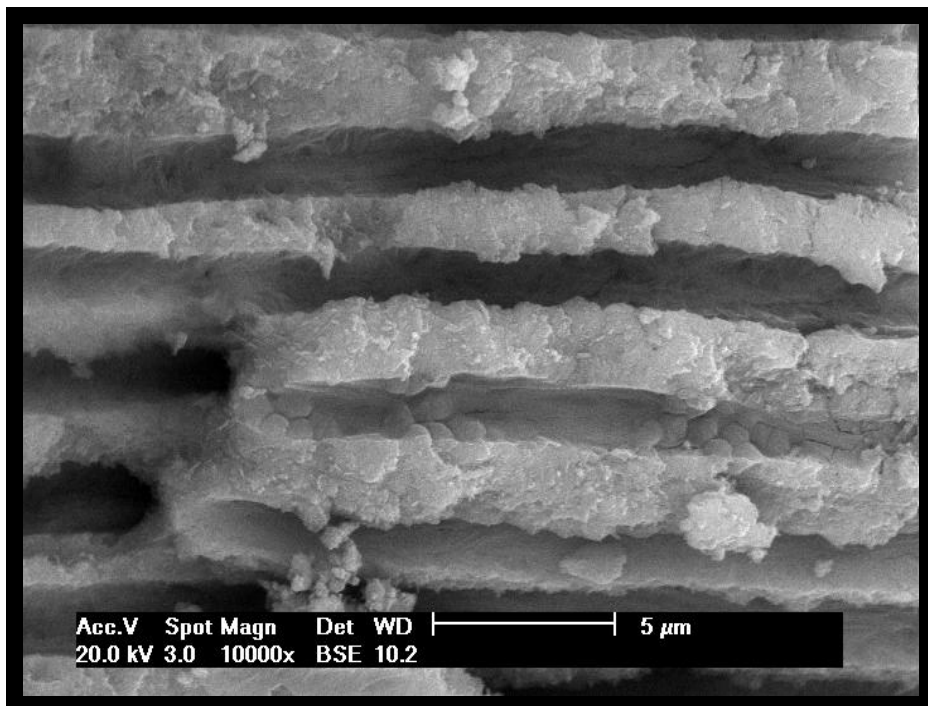


Figura 16 – magnificação de 10.000x no terço médio ao nível da interface dentinária.

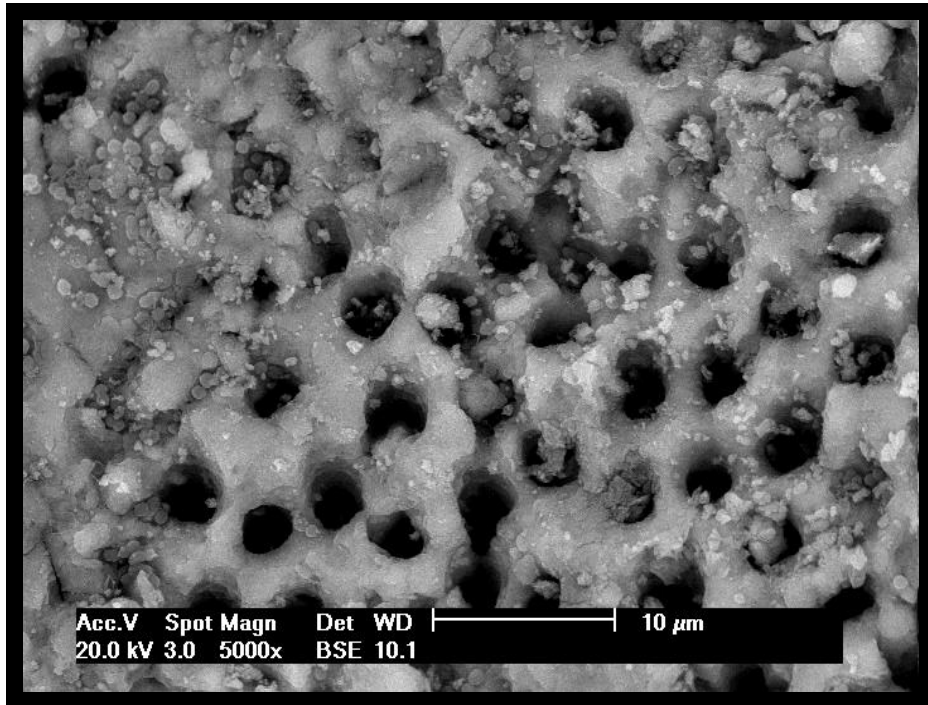


Figura 17 – magnificação de 5.000x no terço cervical ao nível da luz do canal.

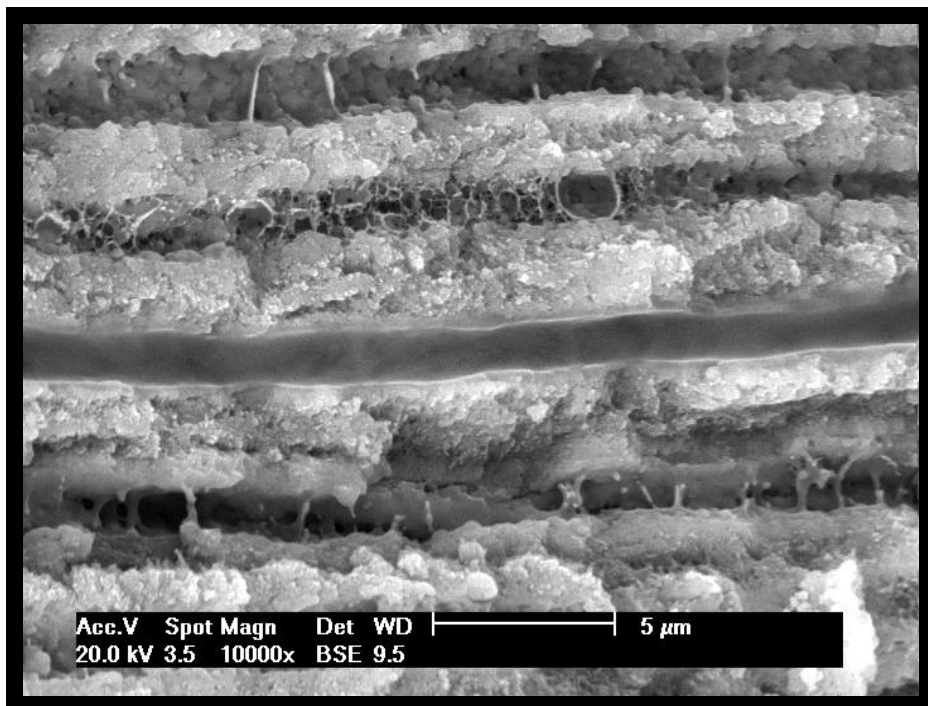


Figura 18 – magnificação de 10.000x no terço cervical ao nível da interface dentinária.

7.4 Imagens MEV – grupo 4 (NaOCl 2,5%)

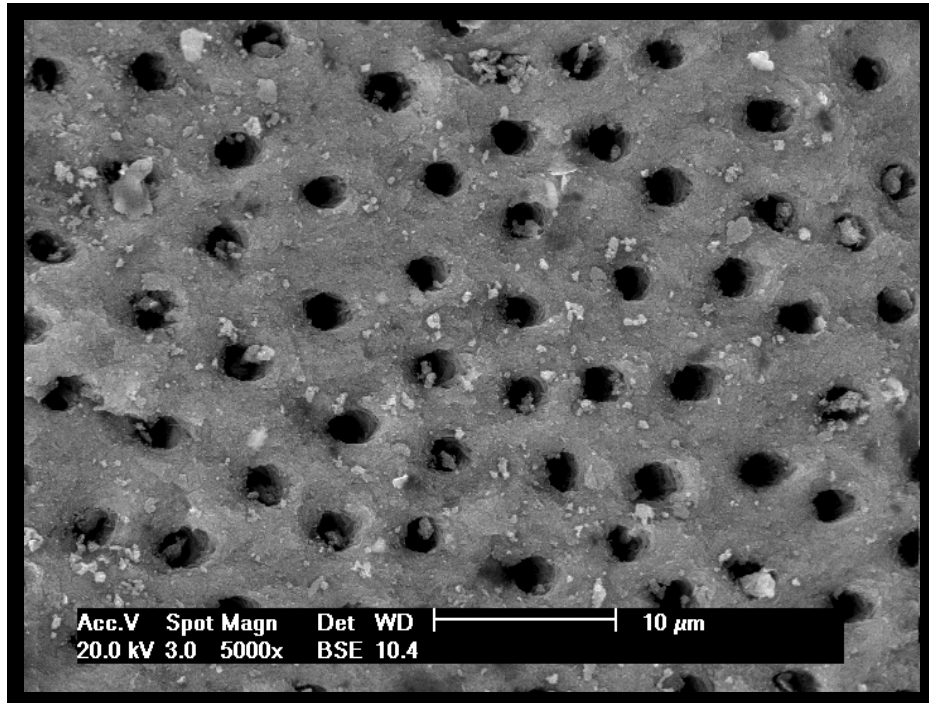


Figura 19 – magnificação de 5.000x no terço apical ao nível da luz do canal.

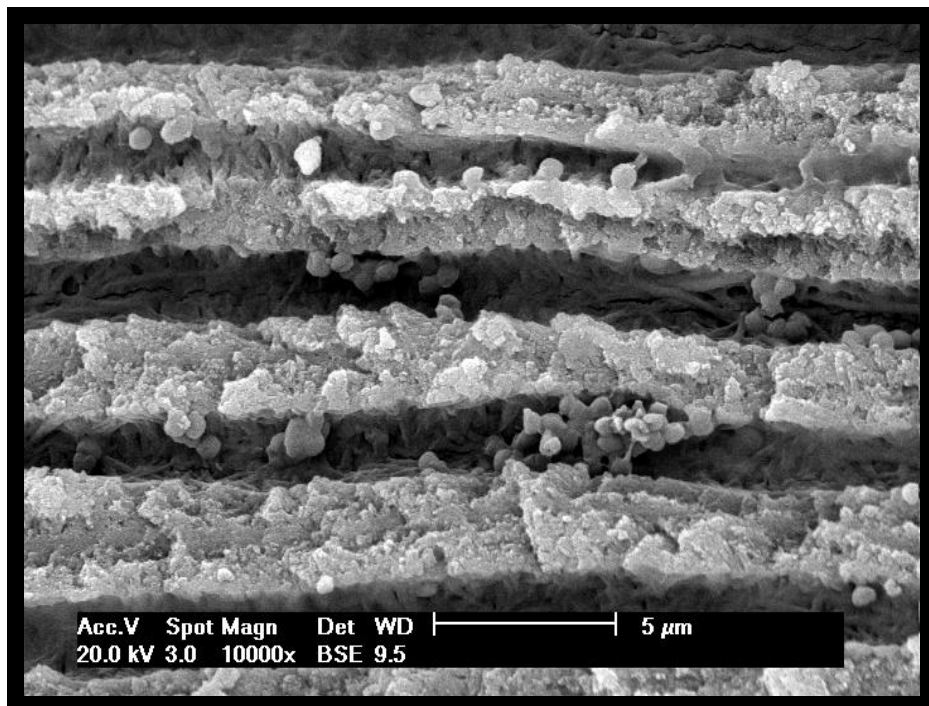


Figura 20 – magnificação de 10.000x no terço apical ao nível da interface dentinária.

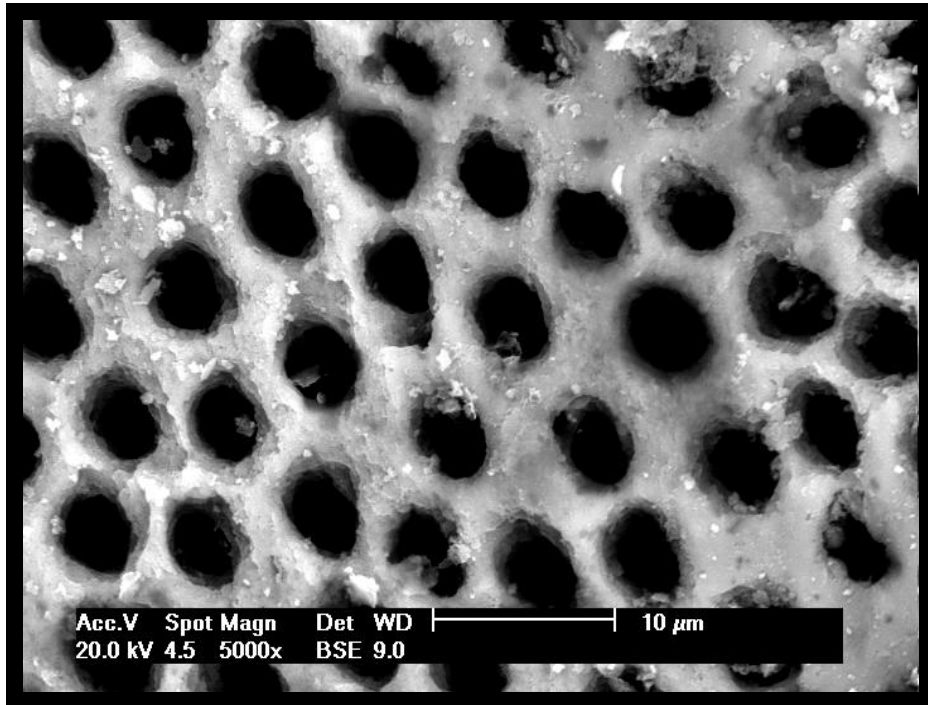


Figura 21 – magnificação de 5.000x no terço médio ao nível da luz do canal.

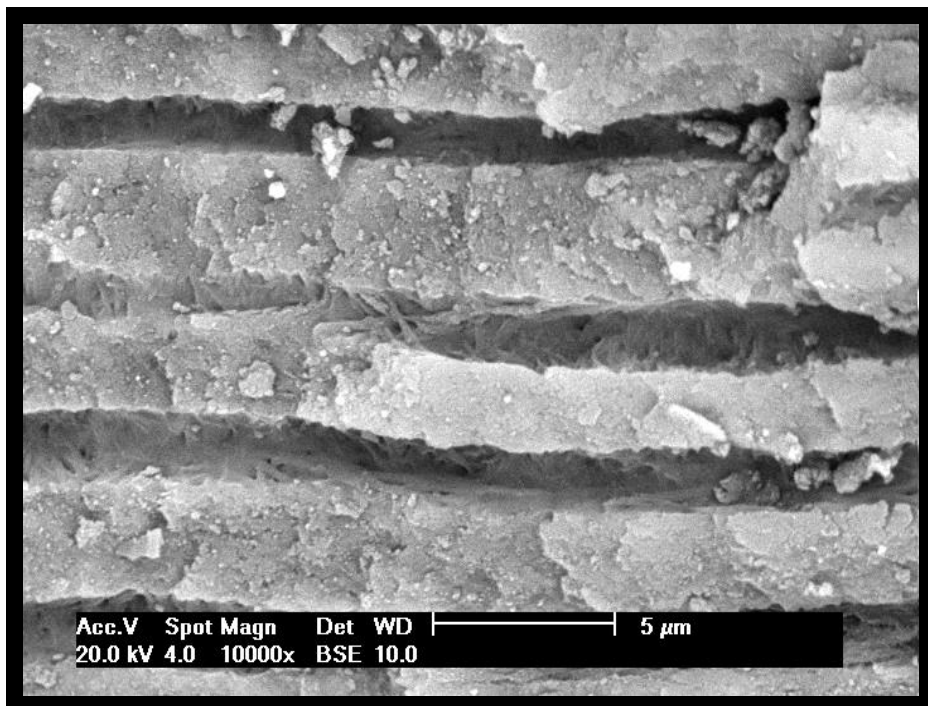


Figura 22 – magnificação de 10.000x no terço médio ao nível da interface dentinária.

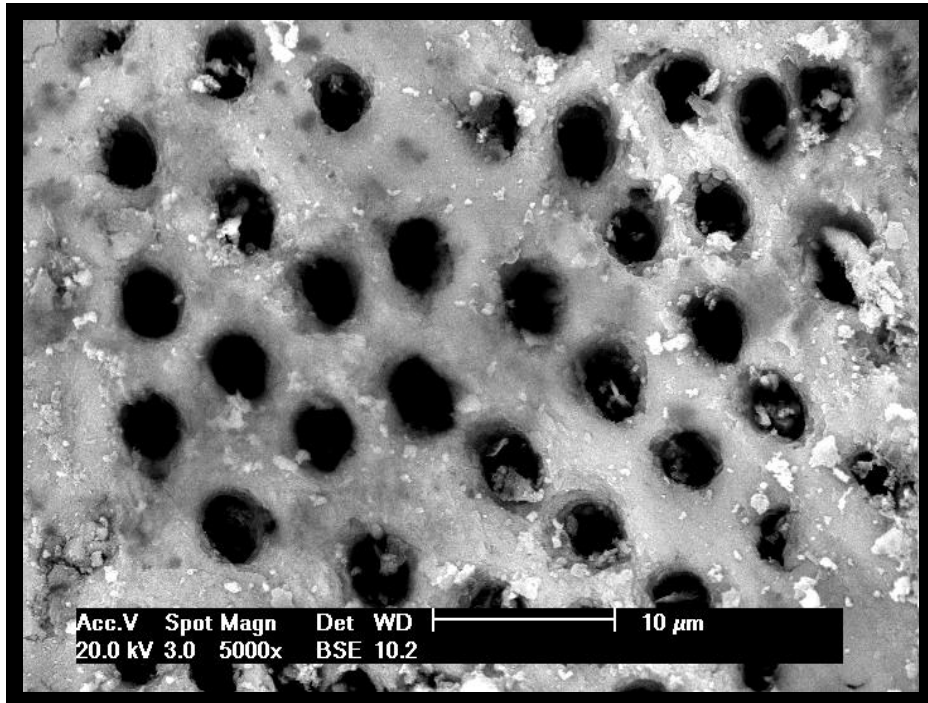


Figura 23 – magnificação de 5.000x no terço cervical ao nível da luz do canal.

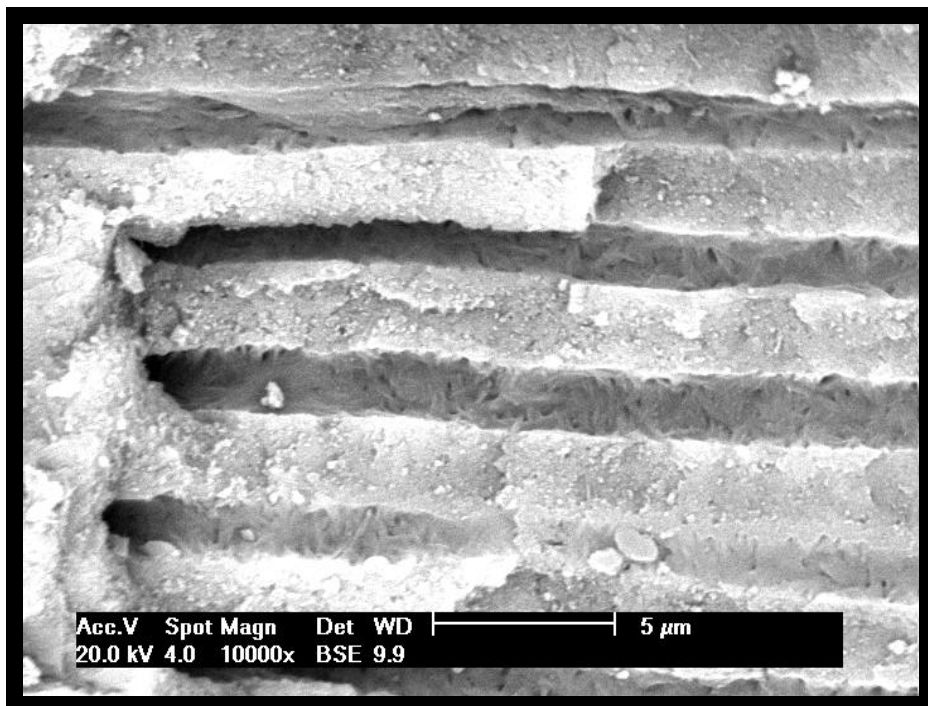


Figura 24 – magnificação de 10.000x no terço cervical ao nível da interface dentinária.

7.5 Imagens MEV – grupo 5 (NaOCl 2,5% + terapia fotodinâmica)

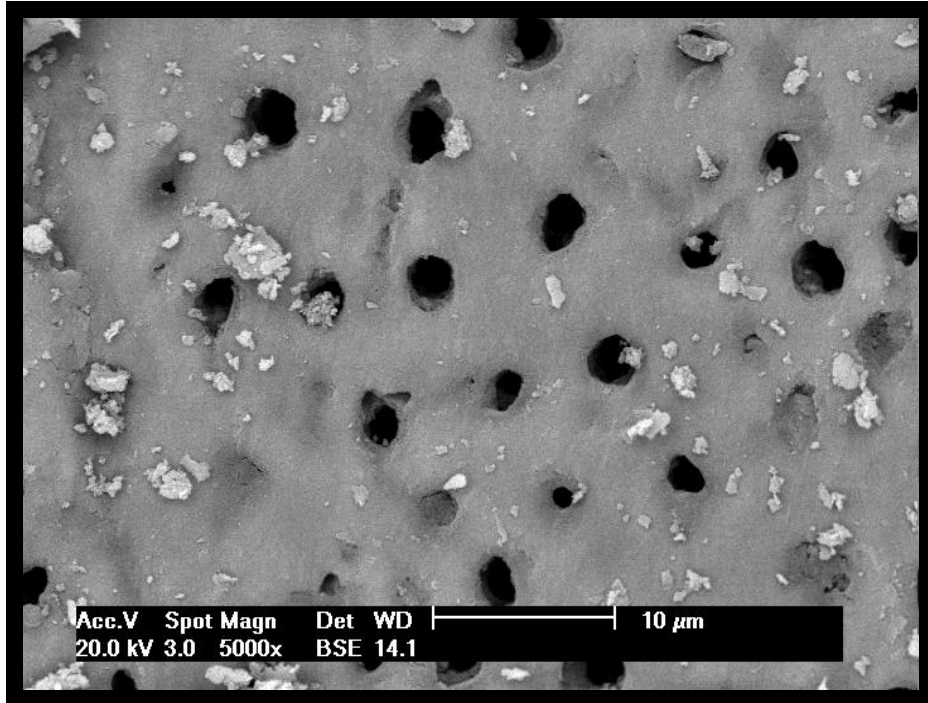


Figura 25 – magnificação de 5.000x no terço apical ao nível da luz do canal.

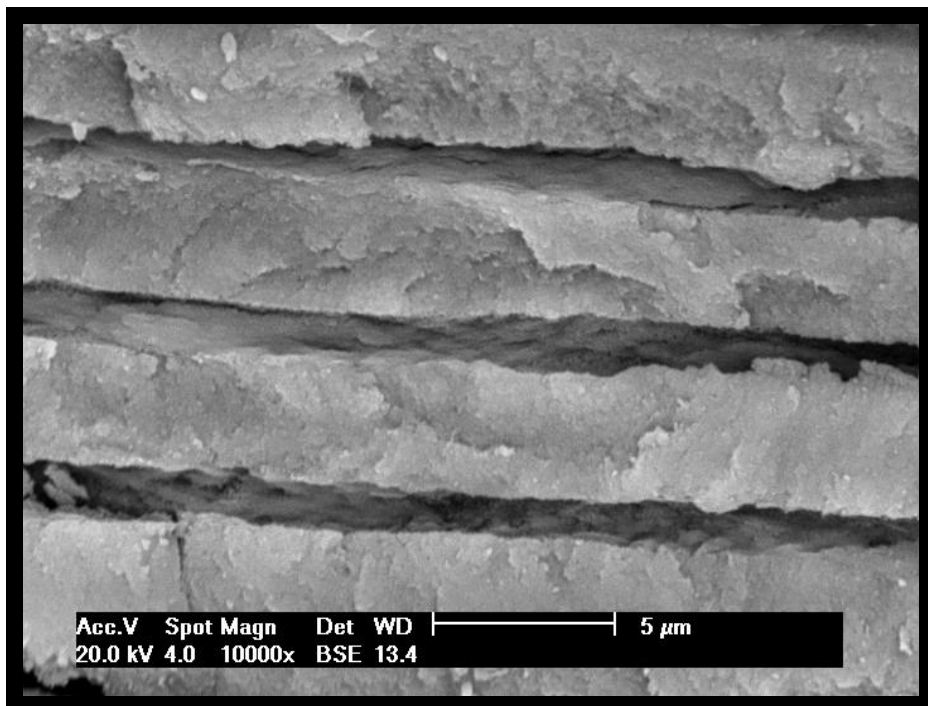


Figura 26 – magnificação de 10.000x no terço apical ao nível da interface dentinária.

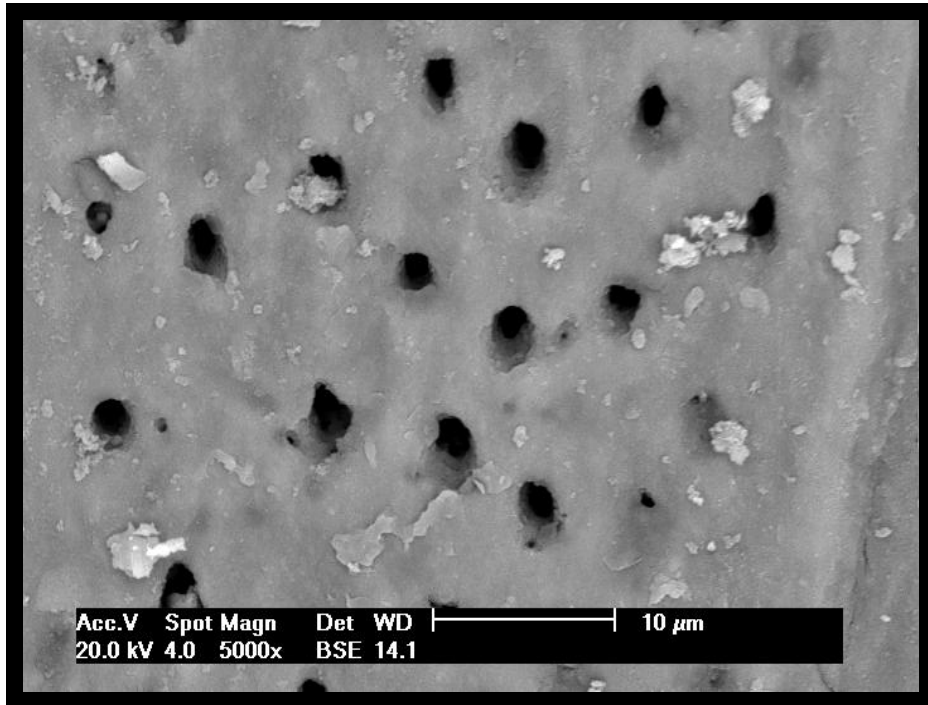


Figura 27 – magnificação de 5.000x no terço médio ao nível da luz do canal.

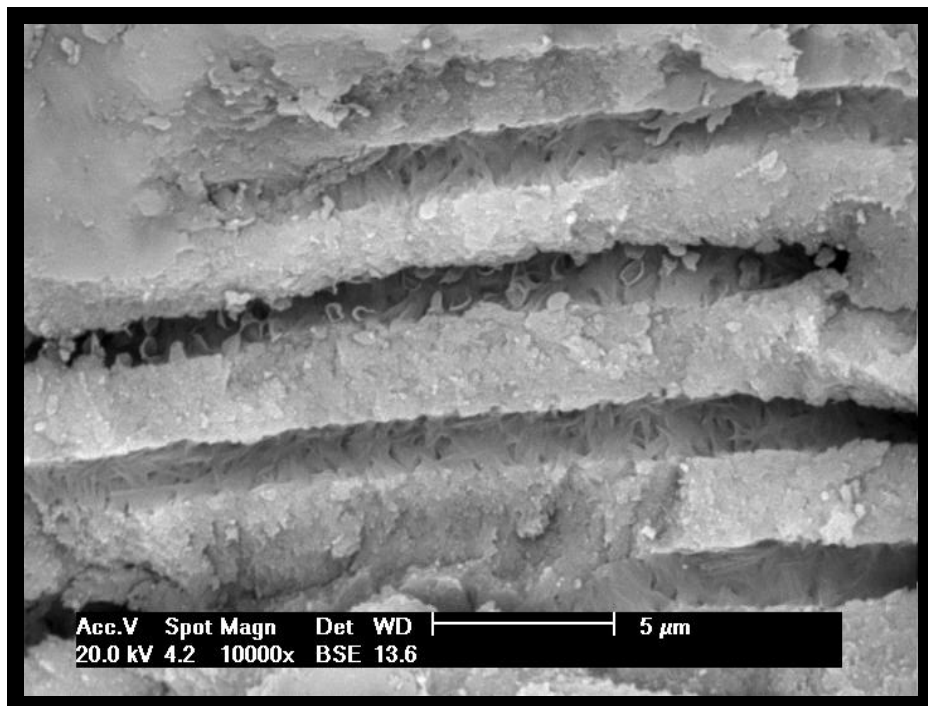


Figura 28 – magnificação de 10.000x no terço médio ao nível da interface dentinária.

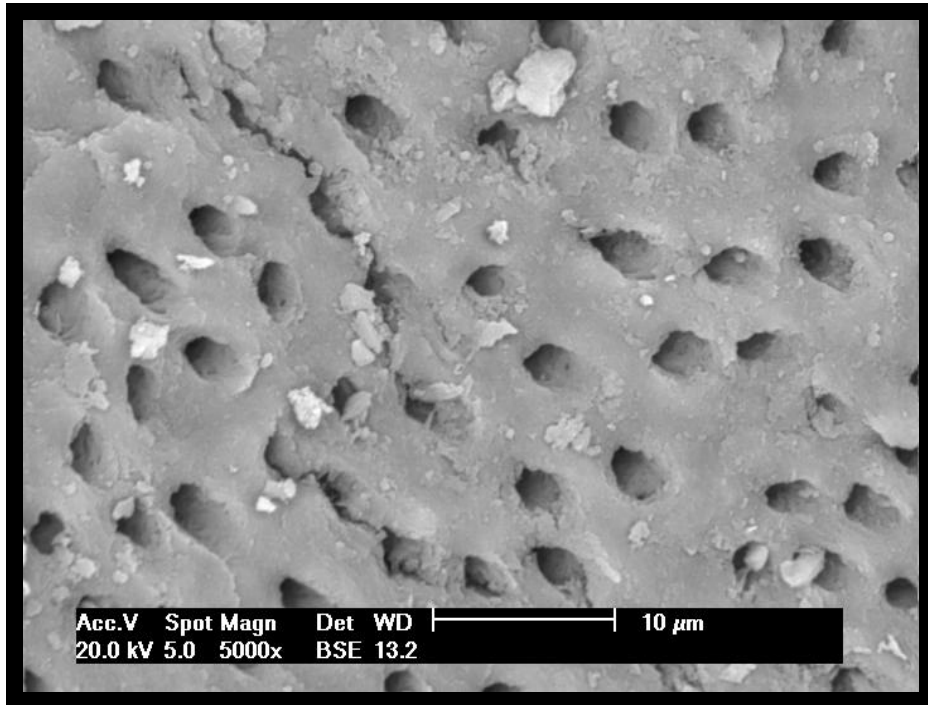


Figura 29 – magnificação de 5.000x no terço cervical ao nível da luz do canal.

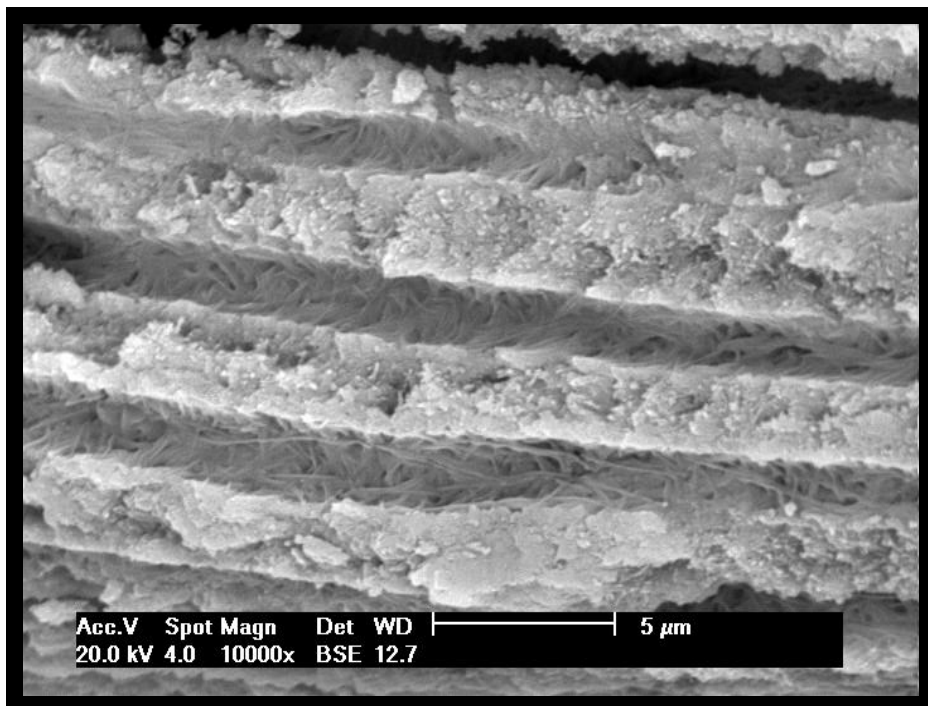


Figura 30 – magnificação de 10.000x no terço cervical ao nível da interface dentinária.