



Contaminação tripla de microrganismos em túbulos dentinários e análise de métodos de desinfecções atuais utilizando diferentes irrigantes: estudo in vitro.

Palavras-chave: atividade antimicrobiana, microrganismos, irrigantes

Bianca Carandina Trevisan, Ana Beatriz Safady Lopes, Brenda Paula Figueiredo de Almeida GOMES

INTRODUÇÃO:

Os produtos e subprodutos de microrganismos desempenham papel importante no desenvolvimento das infecções pulpares e perirradiculares (Baumgartner et al, 1991; Kakehashi et al, 1965). O sucesso do tratamento endodôntico depende do desbridamento completo e do controle de infecção. Para isso, o preparo químico-mecânico visa a remoção dos microrganismos e seus subprodutos localizados no sistema de canais radiculares. No entanto, alguns microrganismos e tecidos necróticos residuais podem persistir em algumas áreas dos canais radiculares, mesmo após um meticuloso preparo químico-mecânico devido à complexidade anatômica radicular e à existência de microrganismos resistentes (Gomes et al, 2001; Gomes et al, 2013; Siqueira Junior, 2018).

Acredita-se que a principal causa de insucesso do tratamento endodôntico e consequente infecção secundária/persistente é a sobrevivência de microrganismos na porção apical do canal radicular e nos túbulos dentinários (Evans et al, 2002; Baumgartner et al 1991; Stuart et al, 2006). A persistência desses microrganismos do biofilme da parede dos canais radiculares acontece devido à capacidade de penetrar os túbulos dentinários em até dois terços da espessura da dentina (Ricucci et al, 2010; Vera et al, 2012) e essa penetração é influenciada por fatores como: presença de oxigênio, disponibilidade nutricional e mecanismo de adesão dos microrganismos. Diferentes instrumentos são usados durante o preparo mecânico do sistema de canais radiculares. No entanto, as dificuldades anatômicas presentes no canal radicular tendem a ser um desafio para um desbridamento adequado (Taha et al, 2010; Weiger et al, 2002).

As SQA são agentes irrigantes com ação antimicrobiana. A associação dessas substâncias com irrigantes como água destilada ou soro fisiológico também pode ter um papel na redução no número de microrganismos e suas endotoxinas (Gomes et al. 2009). Algumas das SQA que mais têm sido usadas como irrigantes em associação com o PQM do sistema de canais radiculares são: hipoclorito de sódio (NaOCl); clorexidina gel e ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (Neelakantan et al, 2019). O uso de substâncias que, além de atividade antimicrobiana de amplo espectro, também tenham habilidade de dissolver tecidos, inativar fatores de virulência e baixa citotoxicidade é altamente recomendado (Safavi et al, 1990; Ferraz et al, 2007).

A eficácia das SQA pode ser otimizada por meio de técnicas de ativação que complementam o método tradicional de depósito dessas substâncias no canal radicular (Haapasalo et al, 2012). O método tradicional de irrigação é o mais utilizado e consiste no uso de seringas, porém é um método que possui reduzida eficiência na limpeza de áreas como istmos, canais laterais, túbulos dentinários, deltas apicais e outras irregularidades (Thomas et al, 2014; Versiani et al, 2015; Duque et al, 2017). Com isso, a agitação mecânica dos irrigantes se tornou uma nova opção para remoção de detritos e alcance de microrganismos do canal radicular nessas áreas.

O easyclean (Easy Equipamentos Odontológicos, Belo Horizonte, Brasil) é um dispositivo de plástico, composto por acrilonitrila butadieno estireno, com tamanho de 25/0.04 e uma seção transversal no formato de “asa de aeronave”. Foi projetado para realização de agitação mecânica de SQA no sistema de canais radiculares e realiza um movimento alternativo (uma volta de 180° no sentido horário seguida de uma volta de 90° no sentido anti-horário). Pode ser usado com contra-ângulo e micromotor em rotação contínua (Duque et al. 2017) e por realizar um movimento mecânico, o contato com as paredes dos canais radiculares não impede que a agitação ocorra ao longo de todo o comprimento do instrumento. O risco de deformação das paredes em detrimento desse contato é mínimo pois o instrumental é feito de plástico e isso permite que sua introdução seja feita até o comprimento de trabalho (Andrade-Junior et al, 2016; Kato et al, 2016).

O objetivo deste estudo visa avaliar, *in vitro*, a eficácia e o grau de limpeza e desinfecção de canais radiculares contaminados com *E. faecalis*, *C. albicans* e *E. coli* fazendo uso do sistema Easyclean para ativação das SQA mais utilizadas em endodontia (NaOCl e Digluconato de clorexidina gel).

METODOLOGIA:

Estudo piloto: Foram avaliados 3 protocolos diferentes de acordo com os períodos: 10, 15 e 21 dias. Cada grupo foi composto por 10 dentes (n=30). Em seguida, foram realizados procedimentos prévios, tais como:

Seleção e preparo dos dentes

Foram selecionados 30 pré-molares inferiores, com ápices completos, raízes retas e canais únicos, extraídos por problemas periodontais ou indicação ortodôntica. Para confirmação dos critérios de seleção foi realizado radiografias periapicais com sensor digital nos planos méso-vestibular e vestibulo-lingual dos elementos (Figura 1). A utilização destes dentes foi submetida para aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisas em humanos da Faculdade de Odontologia de Piracicaba-UNICAMP (CAAE: 63728522.0.0000.5418). As coroas dentais foram removidas com disco de carborundum (KG Sorensen Ind. 30 Com. Ltda., Barueri, SP) e as raízes foram padronizadas no comprimento de 15 milímetros. Os dentes foram submetidos em um protocolo de desinfecção a partir de EDTA 17% por 10 minutos, em NaOCl 5,25% por mais 10 minutos sob agitação constante (Agitador-Aquecedor FANEM, São Paulo, Brasil) e uma nova lavagem com solução de fosfato tamponado por 10 minutos, seguida de água destilada por 1 (Perez et al., 1993; Ferraz et al., 2001). As raízes foram autoclavadas por 30 minutos a 121°C e 1 atm. Finalmente, após a autoclavagem, os dentes foram mantidos por 48 horas em estufa de 10% de CO₂ a 37°C, para a comprovação da esterilidade dos mesmos (Haapasalo & Orstavik, 1987).

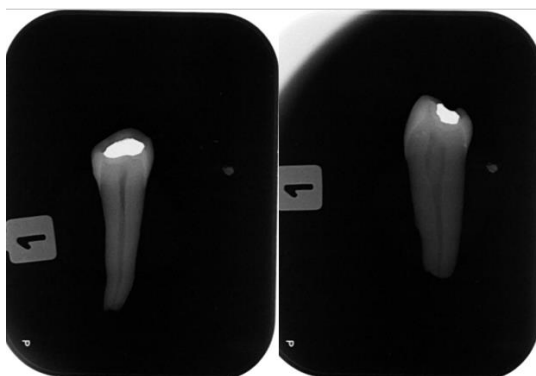


Figura 1. Radiografia periapical dos pré-molares inferiores no sentido méso-vestibular e vestibulo-lingual.

Seleção dos microrganismos para os diferentes protocolos de contaminação

Os microrganismos selecionados para o presente estudo foram *Candida albicans*, *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis*. Foram utilizadas cepas-padrão liofilizadas de *Candida albicans* (ATCC 18804), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) e *Escherichia coli* (ATCC 25922).

Contaminação utilizando a centrífuga em diferentes períodos: A contaminação foi realizada utilizando centrífuga e diferentes ciclos durante 10, 15 e 21 dias. Nos sete primeiros dias foi utilizada a espécie microbiana *E. coli* – Gram-negativa e a partir do oitavo dia de contaminação as espécies microbianas utilizadas foram *E. faecalis* – Gram-positiva e *C. albicans*. Em câmara de fluxo laminar, após crescimento dos microrganismos em placas de Petri, o preparo da suspensão de cada microrganismo foi realizado, separadamente, em SF estéril e apirogênica, contendo 10⁶ células/mL, as quais foram padronizadas em espectrofotômetro, utilizando-se comprimento de onda de 530 nm, 760 nm e 590 nm e densidade óptica de 0,284, 0,298 e 0,324 para *C. albicans*, *E. faecalis* e *E. coli*, respectivamente. No primeiro dia, os espécimes previamente padronizados foram colocados em microtubos com tampas. Oitocentos microlitros de BHI caldo esterilizado foram adicionados a cada tubo. Foi realizado um banho ultrassônico, por 15 min, para permitir maior penetração do meio de cultura nos túbulos dentinários antes do processo de contaminação. O BHI caldo foi removido após o banho ultrassônico e, 800 µL de inóculo foi adicionado aos tubos contendo as amostras e centrifugados a 1.400, 2.000, 3.600 e 5.600g, por 2 ciclos de 5 minutos cada. Um novo inóculo bacteriano foi adicionado aos tubos entre cada centrifugação. Após todos os ciclos de centrifugação, os espécimes foram incubados a 37°C por 24 horas. Este procedimento foi realizado de maneira igual no terceiro, quinto, sétimo dia e por sequência até chegar ao vigésimo primeiro dia da contaminação. No segundo dia de contaminação, os tubos contendo os espécimes

foram agitados (Vortex MA 162, Marconi, Piracicaba, SP) por 10 segundos e o inóculo foi descartado. Foi adicionado 1 mL de BHI caldo estéril e realizado um ciclo de centrifugação a 3.600g por 5 min a 25°C. Novamente foi realizada a incubação, em aerobiose, a 37°C, por 24 horas. Este procedimento foi realizado de maneira igual no quarto, sexto, oitavo dia e por sequência até chegar ao vigésimo dia da contaminação.

Coleta bacteriana inicial e final: após a contaminação, os dentes foram dispostos em uma plataforma metálica estéril que foi levada para o interior da câmara de fluxo laminar. Lá, cada raiz foi irrigada com 1,0 mL de solução salina estéril e a seguir foram coletadas amostras microbiológicas do canal radicular contaminado, com o auxílio de cones de papel absorventes estéreis #20 (TANARI, Tanarian Industrial Ltda, Macapuru, AM). Depois estes cones foram depositados individualmente em tubos estéreis tipo eppendorf (ElkayProducts Inc., Shrewsbury, MA, USA) contendo 1 mL de BHI os quais foram incubados a 37°C.

Preparo das coletas (diluição, contagem das unidades formadoras de colônias-UFC): Imediatamente após cada coleta, as amostras foram agitadas (Vortex MA 162, Marconi, Piracicaba, SP) por 1 minuto e diluídas em série 1/10, 1/100 em BHI estéril (FIG. 6-D). Vinte e cinco µL da diluição 10⁻² foram plaqueados em triplicatas em BHI ágar, MacConkey, Saboround e M Enterococcus incubados em estufa de CO₂ a 37° C por 48 horas. Após o período de incubação, as colônias de microrganismos presentes nas placas foram contadas determinando-se as unidades formadoras de colônias (UFC).

Análise estatística: Após a contagem das unidades formadoras de colônia (UFC) nos diferentes tempos foi realizado a análise estatística pelo teste de Kruskal-Wallis.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Os resultados mostraram que as contaminações de 15 e 21 dias foram estatisticamente significantes (p<0,05) quando comparado a contaminação de 10 dias, tanto nos meios de cultura Sabouraud como no de M Enterococcus (Tabela 1).

Tabela 1. Níveis de crescimento microbiano (UFC/mL) nos diferentes meios de cultura e tempos de contaminação.

Tempo de Contaminação	Sabouraud	MacConkey	M enterococcus
10 dias	8,9×10 ³	4,9×10 ⁶	9,9×10 ⁶
	(7,9×10 ³ – 9,8 x10 ³)	(4,7×10 ⁶ – 5,3×10 ⁶)	(8,9×10 ⁶ - 1,1×10 ⁷)
15 dias	2,8×10 ⁴	2,5×10 ⁵	2×10 ⁷
	(2,4 x10 ⁴ – 3,4 x10 ⁴)	(2,4×10 ⁵ -2,6×10 ⁵)	(1,8×10 ⁷ – 2,2×10 ⁷)
21 dias	2,3 x10 ⁴	7,2×10 ⁵	2,2×10 ⁷
	(2,1 x10 ⁴ – 3,1 x10 ⁴)	(6,5×10 ⁵ - 7,9×10 ⁵)	(2×10 ⁷ – 2,3×10 ⁷)

Em relação ao crescimento microbiano no meio de cultura M enterococcus, observou-se que não houve diferença entre os períodos de contaminação de 15 e 21 dias. No entanto, quando comparado com o protocolo de contaminação de 10 dias, observou-se diferença significativa (Gráfico 1).

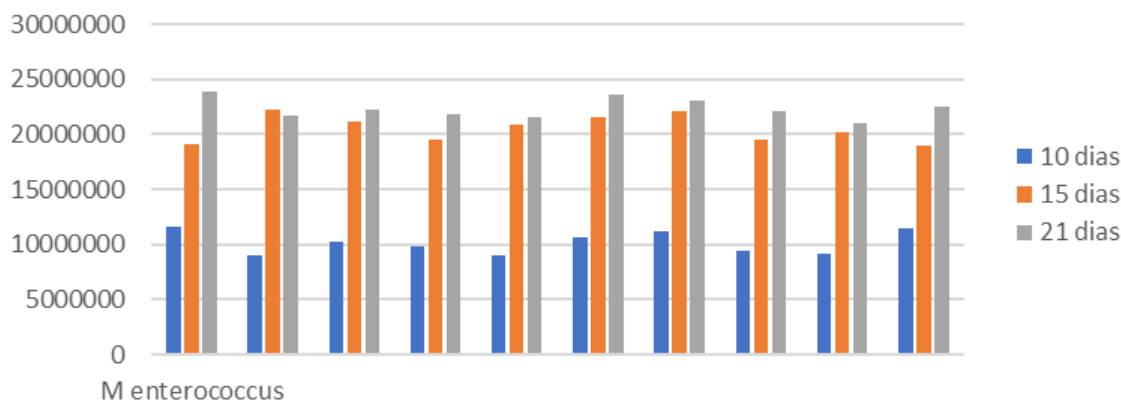


Gráfico 1. Crescimento microbiano nos diferentes tempos de contaminação no meio de cultura M enterococcus

Diversos estudos na literatura utilizam somente o *Enterococcus faecalis* como microrganismo padrão no protocolo de contaminação uma vez que esta bactéria está frequentemente presente nas infecções endodônticas, além de casos de insucesso do tratamento endodôntico (Andrade FB et al. 2015; Samiei M et al. 2016).

Um estudo pilo *in vitro* (Katalinić I et al. 2019) utilizou uma contaminação tripla de microrganismos com posterior avaliação da eficácia do laser na remoção deste biofilme. Os microrganismos utilizados foram *E. faecalis*, *S. aureus* e *C. albicans*. Outro estudo *in vitro* utilizando *Streptococcus sanguis*, *Actinomyces naeslundii* and *Prevotella intermedia* foi realizado com o objetivo de avaliar a penetração destes microrganismos via túbulo dentinários (Perez et al. 1993).

Neste estudo, optou-se por utilizar *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* e *Candida albicans* com o objetivo de utilizar bactérias gram-positivas, gram-negativas e fungos; uma vez que todos estes microrganismos são encontrados nas infecções de origem endodôntica. Além disso, a combinação destes microrganismos é baseada na literatura (Molina 2008; Oliveira 2013).

CONCLUSÃO:

Conclui-se que não houve diferença estatísticas entre os períodos de 15 e 21 dias, com exceção do meio de cultura MacConkey. O protocolo de contaminação proposto poderá viabilizar futuras pesquisas *in vitro* com a utilização de uma contaminação tripla e intratubular de microrganismos presentes nas infecções endodônticas.

(Apoio: FAPESP 2015/23479-5; 2021/13871-6, 2019/19300-0, 2019/10755-5, 2017/25242-8; CNPq 303852/2019-4, 421801/2021-2; CAPES 001).

BIBLIOGRAFIA

1. Andrade FB, Arias MP, Maliza AG, Duarte MA, Graeff MS, Amoroso-Silva PA, Midená RZ, Moraes IG. A new improved protocol for *in vitro* intratubular dentinal bacterial contamination for antimicrobial endodontic tests: standardization and validation by confocal laser scanning microscopy. *J Appl Oral Sci.* 2015 Nov-Dec;23(6):591-8.
2. Andrade-Junior CV, Batista RM, Marceliano-Alves M, Alves FRF, Silva EJNL. Efficacy of a new Activation Device in Irrigant Penetration Into Simulated Lateral Canals. *EurEndod J.* 2016 Sep 29;1(1):1-4.
3. Baumgartner IC, Cuenin PR. Efficacy of several concentrations of sodium hypochlorite for root canal irrigation. *J Endod* 1992; 18: 605-12.
4. Duque JA, Duarte MA, Canali LC, Zancan RF, Vivian RR, Bernardes RA, Bramante CM. Comparative Effectiveness of New Mechanical Irrigant Agitating Devices for Debris Removal from the Canal and Isthmus of Mesial Roots of Mandibular Molars. *J Endod.* 2017 Feb;43(2):326-331
5. Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *IntEndod J* 2002;35:221– 8.
6. Ferraz CC, Gomes BP, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Comparative study of the antimicrobial efficacy of chlorhexidine gel, chlorhexidine solution and sodium hypochlorite as endodontic irrigants. *BrazDent J.* 2007;18(4):294-8
7. Ferraz CC, Gomes BP, 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.
8. Gomes BP, Endo MS, Martinho FC. Comparison of endotoxin levels found in primary and secondary endodontic infections. *J Endod.* 2012 Aug;38(8):1082-6.
9. Gomes BP, Ferraz CC, Vianna ME, Berber VB, Teixeira FB, Souza FJ. *In vitro* antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. *IntEndod J* 2001;34:424-428
10. Gomes BP, Martinho FC, Vianna ME. Comparison of 2.5% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine gel on oral bacterial lipopolysaccharide reduction from primarily infected root canals. *J Endod.* 2009 Oct;35(10):1350-3.

11. Gomes BP, Pinheiro ET, Sousa EL, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CC, de Souza-Filho FJ. *Enterococcus faecalis* in dental rootcanals detected by culture and by polymerase chain reaction analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006 Aug;102:247-53.
12. Gomes BP, Vianna ME, Zaia AA, Almeida JF, Souza-Filho FJ, Ferraz CC. Chlorhexidine in endodontics. *Braz Dent J.* 2013;24:89-102.
13. Haapasalo M, Orstavik D. In vitro infection and disinfection of dental tubules. *J Dent Res* 1987; 1375-1379.
14. Haapasalo M, Shen YA. Current therapeutic options for endodontic biofilms. *Endodontic Topics* 2012;22:79-98.
15. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1965; 20:340-9.
16. Katalinić I, Budimir A, Bošnjak Z, Jakovljević S, Anić I. The photo-activated and photo-thermal effect of the 445/970 nm diode laser on the mixed biofilm inside root canals of human teeth in vitro: A pilot study. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2019 Jun;26:277-283.
17. Kato AS, Cunha RS, da Silveira Bueno CE, Pelegri RA, Fontana CE, de Martin AS. Investigation of the Efficacy of Passive Ultrasonic Irrigation Versus Irrigation with Reciprocating Activation: An Environmental Scanning Electron Microscopic Study. *J Endod.* 2016 Apr;42(4):659-63
18. Molina, Flavio Pires. Associação de *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans* e *Escherichia coli* em canais radiculares e avaliação dos efeitos de extratos naturais sobre os microrganismos e endotoxinas / Flávio Pires Molina; São José dos Campos, 2008. 110p.; il.
19. Neelakantan P, Herrera DR, Pecorari VGA, Gomes BPFA. Endotoxin levels after chemomechanical preparation of root canals with sodium hypochlorite or chlorhexidine: a systematic review of clinical trials and meta-analysis. *Int Endod J.* 2019 Jan;52(1):19-27
20. Perez F, Rochd T, Lodter JP. In vitro study of the penetration of three bacterial strains into root dentine. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1993; 76:97-103.
21. Peters OA, Schönenberger K, Laib A. Effects of four Ni-Ti preparation techniques on root canal geometry assessed by micro computed tomography. *Int Endod J* 2001;34:221-230.
22. Ricucci D, Siqueira JF Jr. Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathological findings. *J Endod* 2010;36:1277- 1288
23. Safavi KE, Spangberg LSW, Langeland K. Root canal dentine tubule disinfection. *J Endod* 1990;16:207-210.
24. Oliveira, Ana Carolina Mascarenhas. Avaliação in vitro da efetividade de substâncias químicas auxiliares e medicações intracanal sobre microrganismos e endotoxina em canais radiculares. Piracicaba, SP, 2013.
25. Samiei M, Shahi S, Abdollahi AA, Eskandarinezhad M, Negahdari R, Pakseresht Z. The Antibacterial Efficacy of Photo-Activated Disinfection, Chlorhexidine and Sodium Hypochlorite in Infected Root Canals: An in Vitro Study. *Iran Endod J.* 2016 Summer;11(3):179-83.
26. Siqueira Junior JF, Rôças IDN, Marceliano-Alves MF, Pérez AR, Ricucci D. Unprepared root canal surface areas: causes, clinical implications, and therapeutic strategies. *Braz Oral Res.* 2018 Oct 18;32(suppl 1):e65
27. Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J Endod.* 2006 Feb;32(2):93-8.
28. Taha, N.A.; Ozawa, T.; Messer, H.H. Comparison of three techniques for preparing oval-shaped root canals. *J. Endod.* 2010, 36, 532-535.
29. Thomas AR, Velmurugan N, Smita S, et al. Comparative evaluation of canal isthmus debridement efficacy of modified EndoVac technique with different irrigation systems. *J Endod* 2014;40:1676-80.
30. Vera J, Siqueira JF Jr, Ricucci D, Loghin S, Fernández N, Flores B, Cruz AG. One- versus two-visit endodontic treatment of teeth with apical periodontitis: a histobacteriologic study. *J Endod* 2012;38:1040-1052.
31. Versiani MA, De-Deus G, Vera J, et al. 3D mapping of the irrigated areas of the root canal space using micro-computed tomography. *Clin Oral Investig* 2015;19: 859-66
32. Vianna ME, Horz HP, Conrads G, Zaia AA, Souza-Filho FJ, Gomes BP. Effect of root canal procedures on endotoxins and endodontic pathogens. *Oral Microbiol Immunol.* 2007 Dec;22(6):411-8.
33. Weiger, R.; ElAyouti, A.; Lost, C. Efficiency of hand and rotary instruments in shaping oval root canals. *J. Endod.* 2002, 28, 580-583.