

**FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA  
MESTRADO EM ODONTOLOGIA  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM CTBMF**

***DAIANE GIRON GRANZOTTO***

**USO DE CRIOTERAPIA EM UM MODELO IN VITRO  
DE INFECÇÃO DE TÚBULOS DENTINÁRIOS DE DENTES BOVINOS  
POR ENTEROCOCCUS FAECALIS**

**Porto Alegre  
2009**

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

**USO DE CRIOTERAPIA EM UM MODELO *IN VITRO*  
DE INFECÇÃO DE TÚBULOS DENTINÁRIOS DE DENTES BOVINOS  
POR *ENTEROCOCCUS FAECALIS***

**DAIANE GIRON GRANZOTTO**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos obrigatórios para obtenção do título de Mestre em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial.

Diagnóstico e terapêutica aplicadas  
*Linha de pesquisa*

**Prof Dr. José Antonio Poli de Figueiredo**  
Orientador

Porto Alegre  
2009

## RESUMO

Este estudo testou os efeitos da crioterapia em um biofilme de *enterococcus faecalis*. Trinta e cinco amostras de 5mm de comprimento obtidas de trinta incisivos inferiores bovinos foram infectadas com *Enterococcus faecalis*(ATCC 19.433) por 20 dias a uma temperatura de 37°C. As amostras foram divididas em quatro grupos: 1- controle, sem tratamento (n=6); 2-crioterapia (n=10), 3 ciclos de 15 segundos de aplicação de nitrogênio líquido com intervalos 1 min (n=10); 3-água destilada, irrigação com 10ml com concomitante aspiração (n=10); 4-hipoclorito de sódio, irrigação com 10ml com concomitante aspiração (n=9). Fixadas as amostras com Glutaraldeído a 25%, realizados cortes longitudinais e então preparados para visualização em MEV com aumentos de 500x a 5000x. Os testes bioestatísticos realizados foram ANOVA, Tukey e Kruskal-Wallis com Mann-Whitney corrigidos pelo método Bonferroni ( $\alpha=0.05$ ).

Nenhum dos grupos foi capaz de eliminar completamente o biofilme de *e. faecalis*. O hipoclorito de sódio se mostrou ser o mais eficaz na remoção do biofilme do que os outros ( $p=0.03$ ). O grupo da crioterapia não obteve diferença significativa em relação ao grupo controle ( $p=0.27$ ) bem como o grupo da água destilada ( $p=0.59$ ), entretanto esse se mostrou mais eficaz quando comparado à crioterapia ( $p=0.03$ ).

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	4
<b>ARTIGO</b> .....	7
<b>DISCUSSÃO</b> .....	17
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	20
<b>ANEXOS</b> .....	22
ANEXO A: ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	23
ANEXO B: FIGURAS .....	30

## 1 INTRODUÇÃO

Crioterapia ou criocirurgia é uma técnica que consiste na aplicação de baixas temperaturas com finalidades terapêuticas. A destruição tecidual alcançada é controlada, porém não-seletiva, e ocorre após ciclos de congelamento e aquecimento espontâneo. O criógeno mais empregado é o nitrogênio (N<sub>2</sub>) líquido, que se apresenta inodoro, não tóxico ou inflamável, cuja temperatura potencial é de -196°C<sup>1</sup>.

Com a queda da temperatura tecidual, a água é cristalizada e a formação de cristais de gelo ocorre, inicialmente, no meio extracelular. Conforme os cristais aumentam de tamanho, mais água é incorporada ao gelo, não podendo mais ser usada como solvente, o que aumenta a concentração de eletrólitos no meio extracelular. Isto cria um ambiente hiperosmótico que resulta na osmose de água para fora das células. Há, então, um aumento da concentração de eletrólitos intracelular, com alteração de pH e desnaturação dos complexos lipídeos-proteínas das células<sup>2-5</sup>

A temperatura média necessária para alcançar destruição tecidual é de, aproximadamente, -20°C<sup>6</sup>. Após o aquecimento, um novo resfriamento faz com que haja formação de cristais de gelo no meio intracelular. Isto ocorre, provavelmente, devido ao rápido congelamento que não permite a saída de água para fora das células. Uma vez formados, os cristais intracelulares causam a ruptura de organelas e da membrana celular, como resultado de diferentes coeficientes de contração térmica. Com o derretimento do gelo, o meio extracelular torna-se ligeiramente mais hipotônico, ocorre entrada de água para as células, seu volume aumenta e causa a ruptura da membrana celular<sup>2-4</sup>.

Na Microbiologia, é vasto o número de pesquisas que abordam o efeito controlador do frio em bactérias, principalmente, com a intenção de evitar sua proliferação. A fim de verificar o efeito da queda brusca e intensa da temperatura, nesses microrganismos, Batista e Sant'Ana Filho<sup>7</sup>, em 2006, verificaram a redução parcial de colônias de *Enterococcus faecalis* cultivadas *in vitro*, pela aplicação de N<sub>2</sub> líquido na forma de *spray*.

Bactérias causam doença pulpar e periodontal; o tratamento endodôntico, por sua vez, visa a eliminar bactérias do canal infectado e prevenir reinfecção. Estudos clínicos têm demonstrado que o preparo químico-mecânico, juntamente com medicamentos antimicrobianos é eficaz na redução bacteriana intracanal, entretanto, algumas bactérias persistem apesar desses esforços. *Enterococcus faecalis* é comumente encontrada em dentes tratados endodonticamente que apresentam infecção persistente. Conseqüentemente, muitos estudos têm avaliado a eficácia de agentes antimicrobianos no combate ao *Enterococcus faecalis*<sup>8</sup>. Tendo em vista que muitas infecções pulpares desenvolvem patologias periapicais, é de interesse do cirurgião bucomaxilofacial, seu tratamento.

Devido à predominância de *Enterococcus faecalis* em dentes com insucesso do tratamento endodôntico, drogas alternativas devem ser consideradas para profilaxia, em casos de risco de desenvolvimento de endocardite infecciosa, durante o retratamento endodôntico. Figdor et al.<sup>9</sup> demonstraram, *in vitro*, a capacidade de o *Enterococcus faecalis* suportar períodos prolongados de ausência de nutrientes em um estado metabólico mínimo.

Estudos, utilizando MEV para avaliar efeito de procedimentos endodônticos e/ou paraendodônticos, são comuns na literatura e servem para visualização topográfica dos eventos, bem como avaliação qualiquantitativa dos distintos tratamentos propostos<sup>10-14</sup>.

Estrela et al.<sup>14</sup> propuseram um modelo de avaliação do biofilme de *Enterococcus faecalis* no sistema de canais radiculares de dentes humanos. Rossi-Fedele e Roberts<sup>15</sup> utilizaram um modelo de biofilme de *Enterococcus faecalis* em dentes bovinos, mas restringiram sua análise aos testes microbiológicos (cultura e moleculares). O modelo em bovinos, no entanto, ficou estabelecido e pode ser um substituto poderoso do modelo de dentina humana para análise em MEV. Schilke et al.<sup>16</sup> já haviam demonstrado não haver diferenças de propriedades físicas entre a dentina bovina e a dentina humana de dentes permanentes. A vantagem está em obterem-se amostras similares em idade e propriedade de dentina, sendo possível distribuir elementos dentários de um mesmo animal para vários grupos experimentais.

A hipótese de a crioterapia com nitrogênio líquido reduzir o biofilme de *Enterococcus faecalis* em dentes bovinos extraídos, tanto em número como em profundidade nos túbulos dentinários, não foi testada até o presente momento.

Entendendo que há potencial para a crioterapia em procedimentos endodônticos e de cirurgia paraendodôntica, este estudo pretende avaliar seu uso em um modelo de biofilme em túbulos dentinários, utilizando os mesmos microorganismos previamente testados, visando à validação dessa proposta terapêutica por meio de microscopia eletrônica de varredura.

**2 ARTIGO**

Submetido para publicação no *Journal of Endodontics* – Fator de impacto 3,36

**ANALYSIS OF LIQUID NITROGEN CRYOTHERAPY TO CONTROL *ENTEROCOCCUS FAECALIS* ROOT CANAL BIOFILM IN A BOVINE MODEL**

Daiane Giron Granzotto<sup>1</sup>, BDS; Manoel Sant'Ana Filho<sup>2</sup>, BDS, MSc, PhD; José Antonio Poli de Figueiredo<sup>3</sup>, BDS, MSc, PhD

1Post-Graduate Program in Dentistry, MSC Student in Oral and Maxillofacial Surgery; Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul-PUCRS, Porto Alegre, Brazil.

2Associate Professor in Oral Pathology; Post-Graduate Program in Dentistry, Federal University of Rio Grande do Sul-UFRGS, Porto Alegre, Brazil.

3Senior Lecturer in Endodontology, Post-Graduate Program in Dentistry, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul-PUCRS, Porto Alegre, Brazil.



## ABSTRACT

This study tested the effect of cryotherapy on *e faecalis* biofilm. Five mm samples from 30 bovine lower incisors were obtained and infected with *Enterococcus faecalis* (ATCC 19.433) for 20 days, and divided into four groups: 1- control group, no treatment (n=6); 2 – cryotherapy, 3 cycles of 15 seconds with liquid nitrogen (n=10); 3 – distilled water (n=10); 4 - sodium hypochlorite (n=9). Longitudinal sections were obtained and observed under SEM (500x to 5000x). ANOVA on ranks with Tukey post-hoc, and Kruskal-Wallis with Mann-Whitney post-hoc and Bonferroni correction method ( $\alpha=0.05$ ) showed that control group proved the biofilm formed accordingly. None of the groups was able to completely remove *e faecalis* biofilm. Sodium hypochlorite was more efficient in biofilm removal than the other groups ( $p=0.03$ ). Cryotherapy was not different from the control group ( $p=0.27$ ) or distilled water ( $p=0.59$ ). Distilled water performed better than the control group ( $p=0.03$ ).

**Key words:** cryotherapy, *Enterococcus Faecalis*, biofilm.

## INTRODUCTION

Cryotherapy or cryosurgery is a technique that applies low temperature with therapeutic purposes. The tissue destruction is controlled but not selective, and occurs following cycles of cooling and spontaneous heating. Liquid nitrogen ( $N_2$ ) is the most employed freezing agent, because it is non-toxic and non-inflammable. Its potential temperature is  $-196\text{ }^\circ\text{C}$  (1).

Several microbiological studies use the controlling ability of this freezing agent, especially to avoid its spread over a certain area. It has been verified that, in colonies of *Enterococcus faecalis* generated *in vitro* by culture, it was possible to partially reduce the amount of these microorganisms (2).

The problem of culture testing of materials is that they do not reproduce the biofilm within a root canal system, which is long standing and penetrating within the

dentinal tubules, imposing greater difficulty to its elimination. To overcome this problem, biofilm models with *e faecalis* have been proposed (3,4). These bacteria are commonly associated with endodontic failure and can survive under stringent conditions for long periods in a dormant stage, with minimal metabolism and lack of nutrients (5).

Studies using scanning electron microscopy (SEM) provide visualization of microorganisms (3) and, although it is not possible to demonstrate their living state, the amount and morphology of the bacteria at the surface of the biofilm can be compared along time and following canal preparation, cleaning or medication procedures (6).

Human samples of root canal *e faecalis* biofilms have been used (3), but ethical issues arise for the obtention of enough number of teeth to provide comparison. The bovine model has proven to be an adequate model to substitute human dentine (7), and microbiological studies with *e faecalis* have successfully been conducted (4). The advantage of the bovine model is that the samples can be closer in age and dentine characteristics, being possible to distribute teeth of the same animal amongst experimental groups.

The aim of this study is to test the hypothesis that cryotherapy has the potential to be used for endodontic treatment and endodontic surgery, using the *e faecalis* biofilm on bovine root canals.

## **MATERIALS AND METHODS**

This study was approved by the Ethics Committee of the Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (protocol CEUA 08/00067).

## Sample preparation

Thirty bovine lower incisors, obtained from animals aging approximately one year and slaughtered for commercial purposes, were removed from the mandibles immediately after slaughtering and kept in 1% sodium hypochlorite (Biodinâmica, Ibiporã, Brazil). The dental crown and apical 3 mm were removed with diamond disks (KG Sorensen, Barueri, Brazil), and each 5 mm in length of the remaining root from the apical portion was cross-sectioned. The remaining pieces, when reaching the 5 mm length, were used as positive controls for bacteria. The dental pulp content was removed with thorough irrigation with 1% sodium hypochlorite (Biodinâmica, Ibiporã, Brazil). The samples were then sterilized in autoclave (Kavo, Joinville, Brazil) for 30 minutes.

## Biofilm preparation

A lineage of anaerobic facultative, gram+ *enterococcus faecalis* (ATCC 19.433) obtained and cultivated at the Clinical Microbiology Laboratory of Pharmacy School at PUCRS, was used in this study.

The thirty-five root samples were manipulated in a laminar flow chapel and immersed in test tube containing BHI (*Brain Heart Infusion*) and 150 µL of overnight culture of *E. faecalis*, which was sealed and left at 37<sup>0</sup>C for 20 days to form the biofilm. Samples were aseptically removed and positioned over a Petry Dish with putty (Speedex, Vigodent, Rio de Janeiro, Brazil) the tip facing the plateau to avoid loss of irrigating solution through the apex. The coronal aspect of the root canal was kept opened to allow intra-canal cleaning procedures. The groups were divided randomly as follows:

Group 1 - Control group – no irrigation was performed (n=6)

Group 2 – Cryotherapy with liquid nitrogen (n=10)

Group 3 – distilled water (n=10)

Group 4 – 1% sodium hypochlorite (negative control) (n=9)

Care was taken to distribute evenly the samples, considering the origin of the animal.

In group 2, three freezing cycles of 15 seconds with resting time of one minute<sup>8</sup>, with the tip within the canal performing in-out motions, liquid nitrogen (White-Martins) were applied. For groups 3 and 4, 10mL of 1% sodium hypochlorite or distilled water, respectively, was used within a plastic syringe (BD Ind. Cirúrgica LTDA, Curitiba, Brazil) with a needle (BD Ind. Cirúrgica LTDA, Curitiba, Brazil) with in-out motions and concomitant aspiration of the excess with a surgical aspirator (Digital Design, Londrina, Brazil) in a vacuum pump (Kavo, Joinville, Brazil). The irrigation procedure would take approximately 20 seconds, followed by aspiration of the irrigation content. Then fixation with 25% glutaraldehyde for 48 hours was performed.

### **SEM preparation**

The roots were sectioned after the creation of longitudinal grooves with diamond discs (KG Sorensen, Barueri, Brazil) external to the root surface, buccally and lingually. Care was taken for the grooves not to reach the canal space. A chisel was placed in one of the grooves and, with the help of a hammer, two halves of the samples showing the root canal space were created. The halves were placed in stubs with the root canal portion facing upwards and gold palladium sputtering was performed. A Philips XL-30 (Philips, Eindhoven, Netherland) scanning electron microscope was used, and images of the root canal surface with magnifications varying from 500x to 5000x intended to obtain the general feature of the samples and the surface areas in greater views to verify the details of the biofilms along the surface and the relation with the dentinal tubules. The area where the sectioning occurred was used to view the dentinal tubules longitudinally. A pool of images was recorded through total scatter by an observer blinded to the group distribution and a senior observer, also blinded as to the irrigation protocols, assessed and recorded the samples into scores, considering the highest score for the set of images of each sample. The scores were as follows:

- 1 – absence of biofilm within the root canal and the dentinal tubules;
- 2 – biofilm in sparse areas of the canal, or bacteria visible with no biofilm;

- 3 – biofilm in several areas of the root canal space, occupying dentinal tubules;
- 4 – the whole root canal surface plenty of biofilm.

### **Statistical analysis**

Following the rank transformation, the data were treated with two approaches. First, Oneway ANOVA on ranks with a Tukey *post-hoc* for  $\alpha = 5\%$  was performed. To confirm, non-parametric tests (Kruskal-Wallis test and Mann-Whitney with Bonferroni correction method) were performed with the same  $\alpha$  subset.

### **RESULTS**

Tables 1 and 2 summarize the findings. Both statistical approaches displayed the same results. The control group proved the biofilm to be formed accordingly. None of the groups was able to completely remove the *e faecalis* biofilm. However, there were statistical significant differences between groups. Sodium hypochlorite was statistically more efficient in biofilm removal than all the other groups ( $p=0.03$ ). Cryotherapy was not different from the control group ( $p=0.27$ ) or distilled water ( $p=0.59$ ). Distilled water performed statistically better than the control group ( $p=0.03$ ). (Figure 1).

### **DISCUSSION**

The search is long for a substitute of sodium hypochlorite to clean the root canal system and remove bacterial biofilm. Sodium hypochlorite weakens dentine (9), can irritate the periapical tissues and is associated with several accidents on practice (10,11) and can be a risk if used during endodontic surgery.

Cryotherapy with liquid nitrogen was thought to be a simple and quick alternative to control the endodontic biofilm (2). However, the results of this study have shown the opposite outcome. Cryotherapy performed worse than irrigation with distilled water. This could be explained for two reasons: first, the physical action of irrigation to arrest some bacteria from the root canal; secondly, the liquid nitrogen probably preserved *e faecalis* rather than destroying them, possibly for the adaptive characteristics of these microorganisms (12).

The bovine model with *e faecalis* biofilm has demonstrated useful features. Under SEM, the dentinal tubular system is easily seen, and the surface morphology of these bacteria was noted. This resource has been applied in previous studies (13,14). Bacteria were found along the dentine walls, inside and along dentinal tubules when the longitudinal view of the tubular system was possible. In some of the sodium hypochlorite samples, although a limited number of bacteria could be seen, a shady contour was denoted along the inter-tubular dentine. It could be speculated that the *e faecalis* were present in the pre-dentine and that their removal molded their surface as a scrap (Figure 2). However, the limitation of SEM is that they show the presence but not their metabolic state or if they are dead or alive. Culture techniques would be needed to provide this sort of information.

Since the association between bacterial infection of the root canal system and apical periodontitis was established through microscopy (15), attempts to understand the endodontic biofilm and its implications has lead to the development of models that mimic the infection and allow comparison of treatment strategies. This bovine root *e faecalis* model using SEM seems to be applicable to test several clinical hypotheses and could be used in further studies.

## REFERENCES

- 1 Batista PS. Análise do efeito do spray de nitrogênio líquido em culturas de bactérias *Enterococcus faecalis* – estudo *in vitro*. Porto Alegre: PUCRS, 2006. PhD thesis.
- 2 Estrela C, Sydney GB, Figueiredo JAP, Estrela CRA. A Model System to Study Antimicrobial Strategies on Endodontic Biofilms. *J Applied Oral Sci* 2009; 17:87-91.

- 3 Rossi-Fedele G, Roberts AP. A preliminary study investigating the survival of tetracycline resistant *Enterococcus faecalis* after root canal irrigation with high concentrations of tetracycline. *Int Endod J* 2007;40:772-777.
- 4 Figdor D, Davies JK, Sundqvist G. Starvation survival, growth and recovery of *Enterococcus faecalis* in human serum. *Oral Microbiol Immunol* 2003;18:234-239.
- 5 Clegg MS, Vertucci FJ, Walker C, Belanger M, Britto LR. The Effect of Exposure to Irrigant Solutions on Apical Dentin Biofilms In Vitro. *J Endod* 2006;32:434-437.
- 6 Schilke R, Bauss O, Lisson JA, Schuckar M, Geurtsen W. Bovine dentin as a substitute for human dentin in shear bond strength measurements. *Amer J Dent* 1999;12:92-96.
- 7 Borges HOI. Uso de crioterapia em dentes inoculados com *enterococcus faecalis* – estudo *in vitro*. Porto Alegre: PUCRS, 2007. PhD thesis.
- 8 Sim TPC, Knowles JC, NG Y-L, Shelton J, Gulabivala K. Effect of sodium hypochlorite on mechanical properties of dentine and tooth surface strain. *Int Endod J* 2001; 34:120-132.
- 9 Gatoto A, Arbelle J, Leiberman A, Yanai-Inbar I. Effects of sodium hypochlorite on soft tissues after its inadvertent injection beyond the root apex. *J Endod* 1991; 17:573-574.
- 10 Kleier DJ, Averbach RE, Mehdipour O. The sodium hypochlorite accident: experience of diplomats of the American Board of Endodontics. *J Endod* 2008; 34:1346-1350.
- 11 Thammavongs B, Correler D, Panoff J-M, Auffray Y, Boutibonnes P. Physiological response of *Enterococcus faecalis* JH2-2 to cold shock: growth at low temperatures and freezing/thawing challenge. *Letters Applied Microbiol* 2008; 23:398-402.
- 12 Turjansky E, Stolar E. Lesiones de piel y mucosas, técnica terapéuticas. Buenos Aires: Editorial Asociación Medica Argentina, 1995.
- 13 Erlandsen S, Lei M, Martin-Lacave I, Dunny G, Wells C. High resolution CryoFESEM of microbial surfaces. *Microsc Microanal* 2003.
- 14 Bergmans L, Moisiadis P, Van Meerbeek B, Quirynen M, Lambrechts P. Microscopic observation of bacteria: review highlighting the use of environmental SEM. *Int Endod J* 2005;38:775-788.
- 15 Nair PNR. Light and electron microscopic studies of root canal flora and periapical lesions. *J Endod* 1987; 13:29-39.

Table 1 – Mean and median of ranks obtained for each group

<b>Group</b>	<b>Control</b>	<b>Cryotherapy</b>	<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>NaOCl</b>
Mean	3.7	3.2	3.1	1.7
Median	4.0	3.0	3.0	2.0
	n=6	n=10	n=10	n=9

Note:  $p < 0.001$

Table 2 – Mann-Whitney and Bonferroni correction method of the comparison between groups

	<b>p</b>	<b>P<sup>1</sup></b>
1x2	0.23	0.27
1x3	0.022	0.0328
1x4	0.001	0.003
2x3	0.591	0.59
2x4	0.001	0.003
3x4	0.0005	0.003



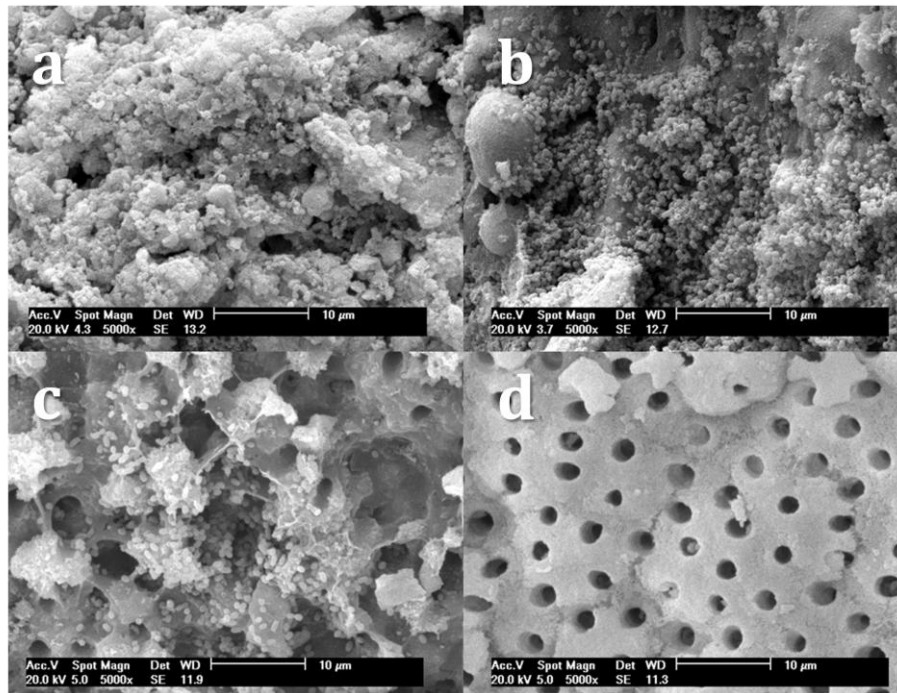


Figure 1 – SEM photomicrographs (5000x) of the groups under study – a: 1(control); b: 2 (cryotherapy); c: 3 (distilled water); d: 4 (NaOCl)

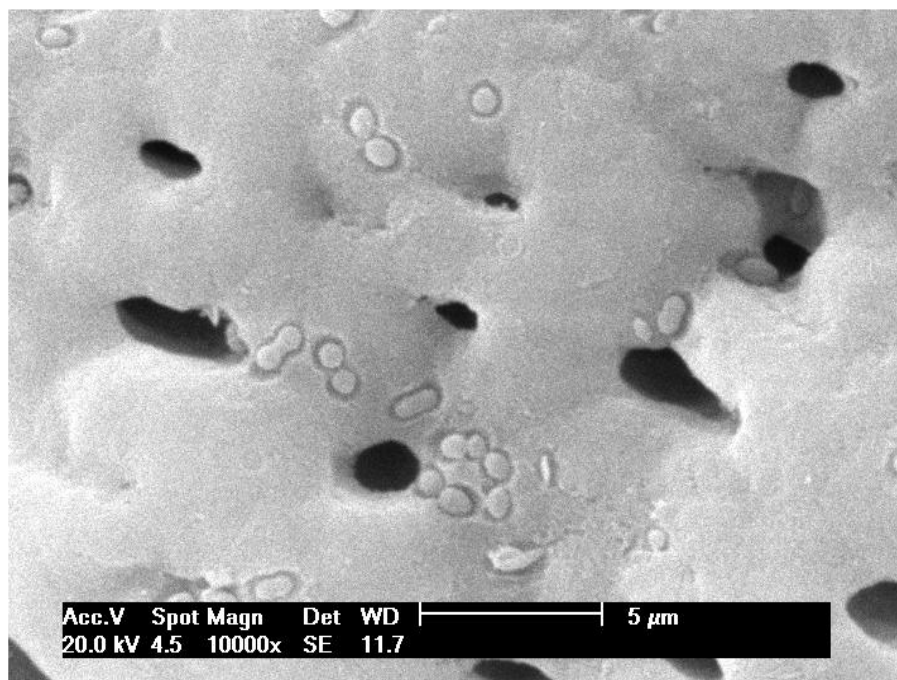


Figure 2 - SEM photomicrograph of group 4

### 3 DISCUSSÃO

Periodontites apicais, decorrentes de infecções pulpares, são complicações freqüentes, bem como a dificuldade no retratamento das mesmas. Isso se justifica pela formação de um biofilme resistente no canal radicular e sistema de túbulos dentinários<sup>17</sup>, podendo, ainda, haver formação de lesão periapical.

A reinfecção do canal radicular deve-se à presença de bactérias remanescentes ao tratamento de canal, exigindo, dessa forma, nova intervenção, seja ela endodôntica ou paraendodôntica. A alta porcentagem de insucesso nos retratamentos deve-se à presença de bactérias no sistema de túbulos dentinários inacessíveis ao preparo químico-mecânico e seus agentes antimicrobianos (NaOCL). O retratamento de canal se torna inviável em situações nas quais o acesso ao canal radicular está impossibilitado por presença de prótese e/ou pino radicular, levando, assim, à cirurgia paraendodôntica. Mesmo em casos em que a infecção é primária, quando há presença de calcificações dentinárias, ou mesmo atresia, o tratamento de escolha é a cirurgia paraendodôntica.

Sabendo que o agente microbiano mundialmente consagrado, o hipoclorito de sódio, não pode ser utilizado em tecido vivo sem que cause necrose ou grave injúria, não é utilizado em cirurgia paraendodôntica. A retroinstrumentação do canal radicular, bem como do uso de um irrigante, faz-se necessário em casos nos quais o canal deve ser descontaminado. O irrigante utilizado, nesses casos, é a água destilada ou soro fisiológico, os quais não apresentam qualquer característica antimicrobiana, somente a de lavagem, o que não é suficiente para eliminar as bactérias presentes.

Estudos atestam a presença de *Enterococcus faecalis* em reinfecções radiculares<sup>9</sup>. Logo, a procura por agentes com propriedades antimicrobianas que possam ser usados em tecidos vivos periapicais incita novas pesquisas.

A crioterapia tem ampla utilização, no meio médico, e pode ser utilizada de diversas formas como: remoção de lesões, conservação de fluidos e, até mesmo, bactérias. Contudo, estudos mostram que sequências repetidas de congelamento e

aquecimento podem desnaturar bactérias. Ao contrário do NaOCl, a crioterapia com nitrogênio líquido pode ser aplicada em tecidos vivos. Já testado em culturas de *Enterococcus faecalis*, o nitrogênio líquido mostrou-se eficiente na redução dos mesmos<sup>7</sup>.

Não havendo diferenças de propriedades físicas entre a dentina bovina e a dentina humana de dentes permanentes<sup>16</sup>, a escolha de dentes bovinos para o estudo objetivou facilitar a visualização em MEV das amostras contaminadas por apresentar túbulos dentinários maiores, permitindo melhor penetração das bactérias durante a cultura e, assim, observar seu comportamento frente aos diferentes líquidos usados no estudo. A visualização por microscopia eletrônica de varredura foi utilizada a fim de avaliar a presença de bactérias em quantidade na superfície do canal radicular e nos túbulos dentinários.

Para comparar um novo agente irrigante, nesse caso, o nitrogênio líquido, o hipoclorito de sódio foi escolhido como controle negativo por ser o padrão ouro da endodontia. A capacidade de remoção física da água destilada também foi analisada em um dos grupos.

Os dentes foram distribuídos, aleatoriamente, em quatro grupos de acordo com os protocolos adotados, sendo eles:

- Grupo 1 (n=6), que não sofreu qualquer irrigação, serviu de controle;
- Grupo 2: nitrogênio líquido (n=10);
- Grupo 3: água destilada (n=10); e
- Grupo 4: NaOCl (n=9).

Analisando as imagens do MEV, escores foram atribuídos, utilizando-se o seguinte critério:

- 1 – ausência de biofilme no canal radicular e nos túbulos dentinários;
- 2 – biofilmes em áreas esparsas do canal radicular;
- 3 – biofilmes em diversas áreas do canal radicular, ocluindo túbulos dentinários;
- 4 – toda a superfície do canal radicular ocupada por biofilme bacteriano.

O Grupo 1, controle positivo, obteve escore mediano de 4; os Grupos 2 e 3 não mostraram diferença significativa, obtendo escore 3; o Grupo 4, com escore 2, mostrou o melhor resultado, apresentando diferença significativa em relação aos outros.

O Grupo 3 (3.1) obteve diferença estatisticamente significativa em relação ao Grupo 1 (3.7), mostrando-se mais efetivo na remoção do biofilme do que o Grupo 2 (3.2), o qual não obteve diferença estatisticamente significante quando comparada ao grupo controle. Possivelmente, essa diferença deva-se à ação física da lavagem da água destilada, promovendo a remoção parcial do biofilme. Talvez o nitrogênio líquido inviabilize as bactérias no canal radicular, mas não as elimine dos túbulos dentinários. Outros estudos, como de Thammavongs et al.<sup>18</sup>, apontam para um aumento de bactérias, quando do uso da crioterapia, provavelmente, por ela agir como agente de preservação das células, mais do que como agente de necrose. No caso dos *Enterococcus faecalis*, esses microrganismos desenvolvem capacidade adaptativa que permite o crescimento da sua população mesmo em condições adversas.

Uma característica relevante, observada em algumas amostras do Grupo 2, foi a presença de rachaduras, levando a crer que possam ter sido causadas pelas temperaturas extremamente baixas alcançadas com a crioterapia, o que deve ser considerado um efeito colateral prejudicial em modelos *in vivo*.

Mesmo se a crioterapia tivesse se mostrado eficaz na redução do biofilme bacteriano, a sua aplicabilidade *in vivo* ainda seria posta em dúvida, devido à possibilidade de agressão ao periodonto e osso alveolar do dente, uma vez que as temperaturas atingidas pelo nitrogênio líquido podem alcançar  $-35^{\circ}$  C.

O presente estudo, portanto, contrapõe sua hipótese experimental, demonstrando que a crioterapia com nitrogênio líquido tem limitado poder de redução de micro-organismos, principalmente espécies resistentes como *Enterococcus faecalis*. Mesmo em procedimentos cirúrgicos, a crioterapia tem valor intrínseco na preservação de tecidos para histopatologia, mas seu uso não pode ser extrapolado além do seu escopo.

## REFERÊNCIAS

- 1 Turjansky E, Stolar E. Lesiones de piel y mucosas, técnica terapéuticas. Buenos Aires: Editorial Asociación Medica Argentina; 1995.
- 2 Emmings FG, Koepf SW, Gage AA. Cryotherapy for benign lesions of the oral cavity. *Journal of Oral Surgery*. 1967;25:320-326.
- 3 Leopard PJ. Cryosurgery, and its application to oral surgery. *British Journal of Oral Surgery*. 1975;13(2):128-152.
- 4 Gage AA, Baust J. Mechanisms of tissue injury in cryosurgery. *Cryobiology*. 1998;37:171-186.
- 5 Thai K-E, Sinclair R. Cryosurgery of benign skin lesions. *Australasian Journal of Dermatology*. 1999;40:175-86.
- 6 Fraser J, Gill W. Observations on ultra-frozen tissue. *British Journal of Surgery*. 1967;54(9):770-6.
- 7 Batista PS, Sant'Ana Filho M. Análise do efeito do *spray* de nitrogênio líquido em culturas de bactérias *Enterococcus faecalis* – estudo *IN VITRO*. Porto Alegre: PUCRS, 2006. Tese (Doutorado em Odontologia), Faculdade de Odontologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2006.
- 8 Dunavant T, et al. Comparative Evaluation of Endodontic Irrigants against *Enterococcus faecalis* Biofilms. *J Oral Endodontics*. 2006;32(6):527-531.
- 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 Vier FV, Figueiredo JAP. Prevalence of different periapical lesions associated with human teeth and their correlation with the presence and extension of apical external root resorption. *International Endodontic Journal*. 2002;35(8):710-719.
- 11 Vier FV, Figueiredo JAP. Internal apical resorption and its correlation with the type of apical lesion. *International Endodontic Journal*. 2004;37(11):730-737.
- 12 Arruda AO, Souza LGE, Biz MT, Ramos IFAS, Figueiredo JAP, Mazzuco C, Tokarski C, et al. Análise – macroscópica e MEV – da superfície do canal radicular após utilização do extrato de própolis como irrigante. *Jornal Brasileiro de Endodontia*. 2005;5(19):280-287.
- 13 Reiss-Araújo C, Figueiredo JAP, Cardoso JC, Albuquerque DS. Influência do pH na ação de alguns tipos de EDTA na forma gel nas paredes do canal. *Revista Brasileira de Odontologia*. 2007;64:210-215.

- 14 Estrela C, Sydney GB, Figueiredo JAP, Estrela CRA. A Model System to Study Antimicrobial Strategies on Endodontic Biofilms. *J Applied Oral Sci.* 2009;17:87-91.
- 15 Rosii-Fedele G, Roberts AP. A preliminary study investigating the survival of tetracycline resistant *Enterococcus faecalis* after root canal irrigation with high concentrations of tetracycline. *International Endodontic Journal.* 2007;40(10):772-777.
- 16 Schilke R, Bauss O, Lisson JA, Schuckar M, Geurtsen W. Bovine dentin as a substitute for human dentin in shear bond strength measurements. *American Journal of Dentistry.* 1999;12(2):92-96.
- 17 Nair PNR. Light and electron microscopic studies of root canal flora and periapical lesions. *J Endod.* 1987,13:29-39.
- 18 Thammavongs B, Correler D, Panoff J-M, Auffray Y, Boutibonnes P. Physiological response of *Enterococcus faecalis* JH2-2 to cold shock: growth at low temperatures and freezing/thawing challenge. *Letters Applied Microbiol.* 2008, 23:398-402.

**ANEXOS**

## ANEXO A: ANÁLISES ESTATÍSTICAS

```
GET DATA /TYPE=XLS
  /FILE='C:\Documents and Settings\All Users\Documentos\MWC01-Cons2009\Fig'+
  '-DaianeGranzotto\Resultados-v02.xls'
  /SHEET=name 'Plan1'
  /CELLRANGE=range 'A1:C36'
  /READNAMES=on
  /ASSUMEDSTRWIDTH=32767.
DATASET NAME DataSet1 WINDOW=FRONT.
```

### Dataset Name

#### Warnings

The active dataset will replace the existing dataset named DataSet1.
--

```
ONEWAY
  cont BY grupo
  /STATISTICS DESCRIPTIVES
  /MISSING ANALYSIS
  /POSTHOC = TUKEY ALPHA(.05).
```

### Oneway

[DataSet1]

#### Descriptives

cont

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound
1	6	3.67	.516	.211	3.12	4.21
2	10	3.20	.789	.249	2.64	3.76
3	10	3.10	.316	.100	2.87	3.33
4	9	1.67	.500	.167	1.28	2.05
Total	35	2.86	.912	.154	2.54	3.17

#### Descriptives

cont

	Minimum	Maximum
1	3	4
2	2	4
3	3	4
4	1	2
Total	1	4

#### ANOVA

cont

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	18.452	3	6.151	19.391	.000
Within Groups	9.833	31	.317		
Total	28.286	34			



## Post Hoc Tests

### Multiple Comparisons

Dependent Variable: cont  
Tukey HSD

(I) grupo	(J) grupo	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	.467	.291	.391	-.32	1.26
	3	.567	.291	.229	-.22	1.36
	4	2.000*	.297	.000	1.19	2.81
2	1	-.467	.291	.391	-1.26	.32
	3	.100	.252	.978	-.58	.78
	4	1.533*	.259	.000	.83	2.24
3	1	-.567	.291	.229	-1.36	.22
	2	-.100	.252	.978	-.78	.58
	4	1.433*	.259	.000	.73	2.14
4	1	-2.000*	.297	.000	-2.81	-1.19
	2	-1.533*	.259	.000	-2.24	-.83
	3	-1.433*	.259	.000	-2.14	-.73

\*. The mean difference is significant at the .05 level.

## Homogeneous Subsets

cont

Tukey HSD<sup>a,b</sup>

grupo	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
4	9	1.67	
3	10		3.10
2	10		3.20
1	6		3.67
Sig.		1.000	.189

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 8.372.
- b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

```

NPAR TESTS
  /K-W=cont BY grupo(1 4)
  /MISSING ANALYSIS.
    
```

## NPar Tests

[DataSet1]

## Kruskal-Wallis Test

## Ranks

	grupo	N	Mean Rank
cont	1	6	27.00
	2	10	21.50
	3	10	20.20
	4	9	5.67
	Total	35	

Test Statistics<sup>a,b</sup>

	cont
Chi-Square	21.620
df	3
Asymp. Sig.	.000

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: grupo

\*\*\*\*\*.

```

NPAR TESTS
  /M-W= cont BY grupo(1 2)
  /MISSING ANALYSIS.

```

## NPar Tests

[DataSet1]

## Mann-Whitney Test

## Ranks

	grupo	N	Mean Rank	Sum of Ranks
cont	1	6	10.17	61.00
	2	10	7.50	75.00
	Total	16		

Test Statistics<sup>b</sup>

	cont
Mann-Whitney U	20.000
Wilcoxon W	75.000
Z	-1.195
Asymp. Sig. (2-tailed)	.232
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.313 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: grupo

```

NPAR TESTS
  /M-W= cont BY grupo(1 3)
  /MISSING ANALYSIS.

```

## NPar Tests

[DataSet1]

## Mann-Whitney Test

## Ranks

	grupo	N	Mean Rank	Sum of Ranks
cont	1	6	11.33	68.00
	3	10	6.80	68.00
	Total	16		

Test Statistics<sup>b</sup>

	cont
Mann-Whitney U	13.000
Wilcoxon W	68.000
Z	-2.292
Asymp. Sig. (2-tailed)	.022
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.073 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: grupo

```

NPAR TESTS
  /M-W= cont BY grupo(1 4)
  /MISSING ANALYSIS.

```

## NPar Tests

[DataSet1]

## Mann-Whitney Test

## Ranks

	grupo	N	Mean Rank	Sum of Ranks
cont	1	6	12.50	75.00
	4	9	5.00	45.00
	Total	15		

Test Statistics<sup>b</sup>

	cont
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	45.000
Z	-3.334
Asymp. Sig. (2-tailed)	.001
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.000 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: grupo

```

NPAR TESTS
  /M-W= cont BY grupo(2 3)
  /MISSING ANALYSIS.

```

## NPar Tests

[DataSet1]

## Mann-Whitney Test

## Ranks

	grupo	N	Mean Rank	Sum of Ranks
cont	2	10	11.10	111.00
	3	10	9.90	99.00
	Total	20		

Test Statistics<sup>b</sup>

	cont
Mann-Whitney U	44.000
Wilcoxon W	99.000
Z	-.538
Asymp. Sig. (2-tailed)	.591
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.684 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: grupo

## NPAR TESTS

```
/M-W= cont BY grupo(2 4)
/MISSING ANALYSIS.
```

## NPar Tests

[DataSet1]

## Mann-Whitney Test

## Ranks

	grupo	N	Mean Rank	Sum of Ranks
cont	2	10	13.90	139.00
	4	9	5.67	51.00
	Total	19		

Test Statistics<sup>b</sup>

	cont
Mann-Whitney U	6.000
Wilcoxon W	51.000
Z	-3.347
Asymp. Sig. (2-tailed)	.001
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.001 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: grupo

## NPAR TESTS

```
/M-W= cont BY grupo(3 4)
/MISSING ANALYSIS.
```

## NPar Tests

[DataSet1]

## Mann-Whitney Test

## Ranks

	grupo	N	Mean Rank	Sum of Ranks
cont	3	10	14.50	145.00
	4	9	5.00	45.00
	Total	19		

Test Statistics<sup>b</sup>

	cont
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	45.000
Z	-3.961
Asymp. Sig. (2-tailed)	.000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.000 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: grupo

```

SORT CASES BY grupo .
SPLIT FILE
  LAYERED BY grupo .
fre cont/stat=median.

```

## Frequencies

[DataSet1]

## Statistics

cont

1	N	Valid	6
		Missing	0
	Median		4.00
2	N	Valid	10
		Missing	0
	Median		3.00
3	N	Valid	10
		Missing	0
	Median		3.00
4	N	Valid	9
		Missing	0
	Median		2.00

cont

grupo			Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
1	Valid	3	2	33.3	33.3	33.3
		4	4	66.7	66.7	100.0
	Total	6	100.0	100.0		
2	Valid	2	2	20.0	20.0	20.0
		3	4	40.0	40.0	60.0
		4	4	40.0	40.0	100.0
	Total	10	100.0	100.0		
3	Valid	3	9	90.0	90.0	90.0
		4	1	10.0	10.0	100.0
	Total	10	100.0	100.0		
4	Valid	1	3	33.3	33.3	33.3
		2	6	66.7	66.7	100.0
	Total	9	100.0	100.0		

split file off.

## ANEXO B: FIGURAS

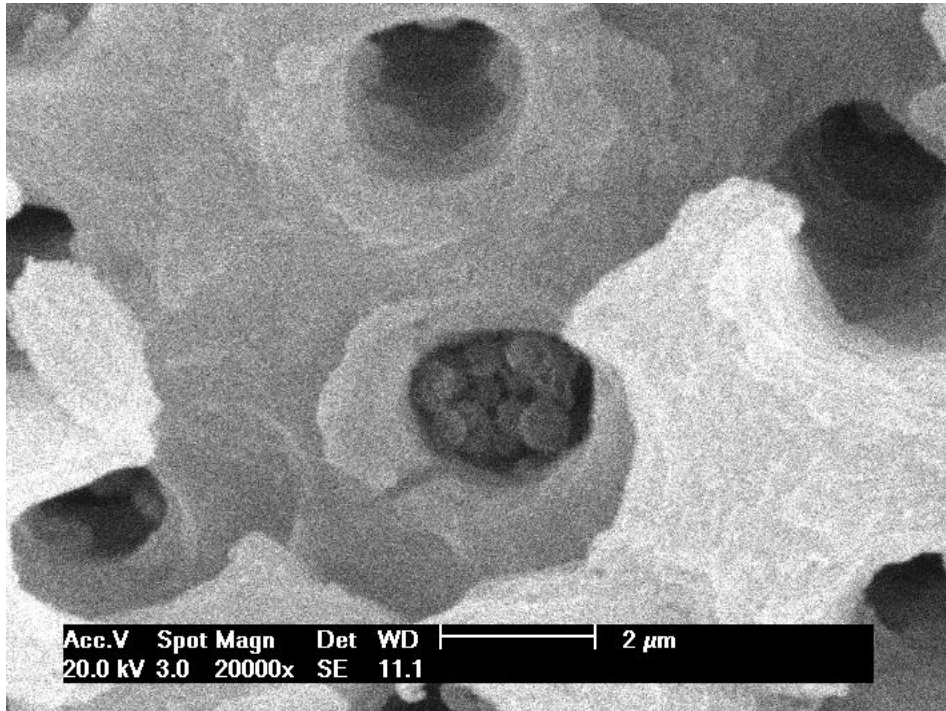


Figura 1: Abertura de um túbulo dentinário, contendo *enterococcus faecalis*, Grupo 3 (água destilada). Vista com aumento de 20000x

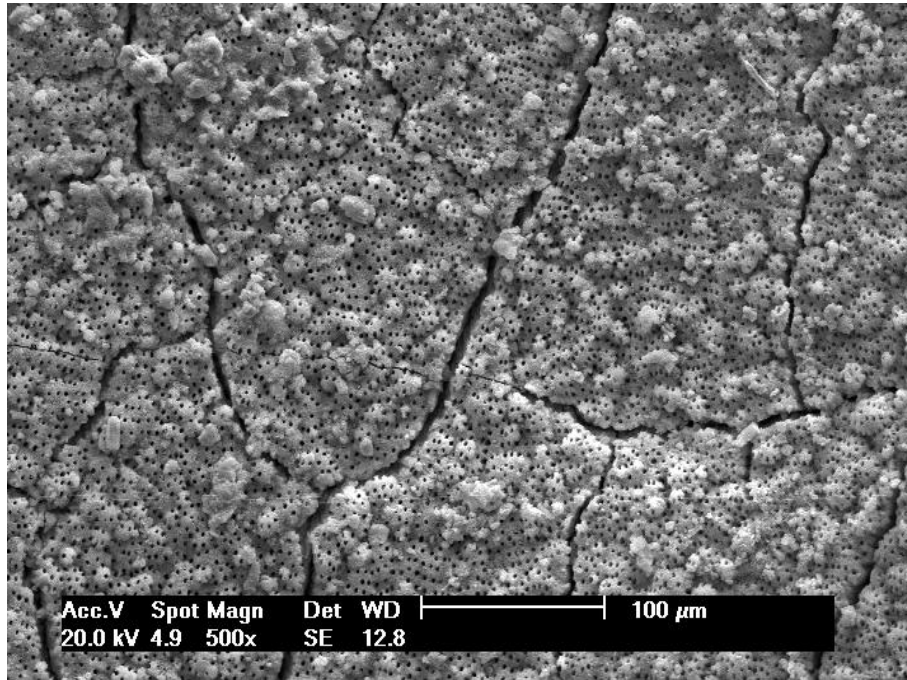


Figura 2: Trincas de uma amostra do Grupo 2 (crioterapia). Vista com aumento de 500x



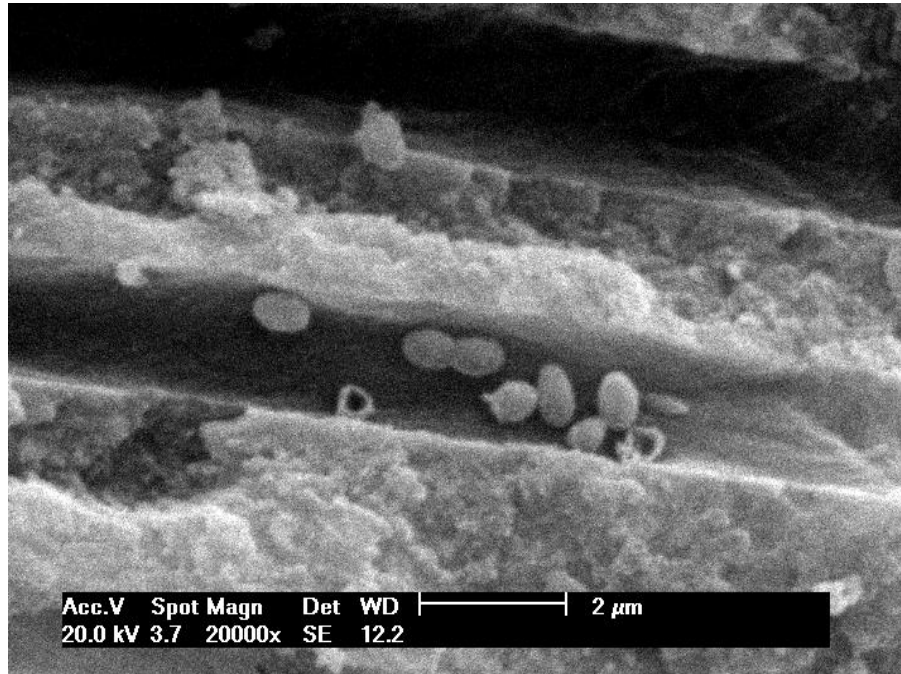


Figura 3: Interior de um túbulo dentinário do Grupo 2 (crioterapia).  
Vista com aumento de 20000x