

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

***FELIPPE LEHUGEUR***

***AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIMICROBIANO DA FOTOATIVAÇÃO A LASER E  
DA CRIOTERAPIA EM CANAIS RADICULARES INOCULADOS COM  
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**

***AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIMICROBIANO DA FOTOATIVAÇÃO A LASER E  
DA CRIOTERAPIA EM CANAIS RADICULARES INOCULADOS COM  
ENTEROCOCCUS FAECALIS***

FELIPPE LEHUGEUR

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

*Linha de pesquisa*

Diagnóstico e terapêutica aplicadas

**Prof. Dr. Claiton Heitz**

Orientador

Porto Alegre  
2009

## RESUMO

Este estudo testou o efeito antimicrobiano do hipoclorito de sódio a 2%, da fotoativação a laser de baixa potência e da crioterapia. As raízes de trinta e cinco dentes monorradiculares foram divididas em quatro grupos e inoculadas com *Enterococcus faecalis* (ATCC 2212), mantendo o cultivo deste microrganismo por 80 dias. Os grupos foram divididos da seguinte forma: 1- controle positivo, hipoclorito de sódio (n=5); 2- fotoativação a laser de baixa potência ( $\lambda=830\text{nm}$ ), uma aplicação durante um período de 40 segundos numa potência de 100 mW (n=10); 3- crioterapia, uma aplicação por 40 segundos com nitrogênio líquido (n=10); 4- associação dos tratamentos realizados no grupo 2 e 3, respectivamente (n=10). Antes e depois dos tratamentos foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônias presentes no canal radicular. Foi descrito o logaritmo em base dez desta variável pela média e o desvio padrão. Para a comparação das médias dos logaritmos, foi utilizada a análise de variância ANOVA e o teste post hoc de Tukey. Para comparar a evolução nos dois tempos entre os grupos, foi utilizada a análise de variância para medidas repetidas. O hipoclorito de sódio a 2% foi mais eficaz na redução das bactérias presente nos canais radiculares em comparação aos outros tratamentos, que não apresentaram diferença estatística na ação antimicrobiana, embora a associação da fotoativação a laser com a crioterapia tenha apresentado uma ação mais satisfatória em relação aos grupos 3 e 4. Concluimos que o hipoclorito de sódio a 2% é a técnica mais indicada para a descontaminação do canal radicular inoculados com *Enterococcus faecalis*.

## LISTA DE GRÁFICOS E FIGURAS

Tabela 1. Média das variáveis medianas e dos logaritmos da variável no pré-tratamento e no pós-tratamento.....	18
Gráfico 1. . Gráfico da variação do logaritmo em base dez .....	19

**LISTA DE SÍMBOLOS**

NaOCl – hipoclorito de sódio

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

nm - nanômetro

J/cm<sup>2</sup> – Joules por centímetro quadrado

$\lambda$  – comprimento de onda

mW - miliwatt

mL – mililitro

°C – graus Celsius

μL - microlitro

mm – milímetro

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>7</b>
<b>2. ARTIGO.....</b>	<b>12</b>
<b>3. DISCUSSÃO .....</b>	<b>23</b>
<b>4. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>25</b>
<b>ANEXO A.....</b>	<b>29</b>
<b>ANEXO B.....</b>	<b>30</b>
<b>ANEXO C .....</b>	<b>32</b>
<b>ANEXO D .....</b>	<b>33</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A polpa dental é um tecido conjuntivo de origem mesodérmica, composto de células, substância fundamental, fibras, vasos sanguíneos, vasos linfáticos e nervos. A situação anatômica desse tecido contido no interior de um canal, delimitado por paredes de dentina nas porções coronárias e radiculares permite que, em condições normais, seja mantida sua esterilidade. No entanto, uma série de fatores físicos, químicos e biológicos pode expor a estrutura à contaminação e proliferação microbianas e, conseqüentemente, favorecer a sua infecção e a extensão do processo infeccioso à região periapical<sup>1</sup>.

Os agentes irritantes para a polpa dental são classificados como: mecânicos, térmicos, elétricos, energias radiantes, químicos e microrganismos. No entanto, os microrganismos são considerados os principais responsáveis por lesões ao órgão pulpar. Quando a polpa é exposta à saliva contaminada com a microbiota bucal, ocorrem alterações patológicas na polpa e tecidos periapicais.

Um estudo realizado demonstrou que as bactérias predominantemente encontradas nos 5 mm apicais do canal radicular foram: *Actinomyces* sp, *Lactobacillus* sp., *Prevotella melaninogenica* (ex- *Bacteroides melaninogenicus*), *Peptostreptococcus* sp., *Bacteroides* sp., *Veillonella* sp., *Enterococcus faecalis*, *Fusobacterium nucleatum* e *Streptococcus mutans*. Este estudo demonstrou a predominância de anaeróbios estritos (68%) na porção apical dos dentes com canais infectados, com cáries, exposição pulpar e lesões periapicais<sup>2</sup>.

A presença de tecido necrótico e microrganismos podem causar uma infecção persistente no canal radicular. A ação de corte dos instrumentos endodônticos produz a *smear layer* composta de material orgânico e inorgânico, assim como detritos de dentina, tecido mole, e microrganismos<sup>3</sup>. A longo prazo, o sucesso do tratamento endodôntico

depende da remoção completa de detritos dos canais radiculares. Contudo, apenas a instrumentação mecânica não é suficiente para eliminar este material. Acredita-se que o uso de duas soluções de irrigação, NaOCl a 5,25% para dissolver o conteúdo orgânico e solução de EDTA a 17% para dissolver os detritos inorgânicos. No entanto, tem sido relatado que a solução de NaOCl a 5,25%, embora tenha um efeito bactericida, não esteriliza o canal radicular. Algumas bactérias podem sobreviver dentro dos túbulos dentinários ou em áreas inacessíveis ao preparo do canal radicular, porque a *smear layer* oblitera os condutos radiculares, impedindo o contato direto da solução irrigadora com os microrganismos<sup>4</sup>.

A irradiação com diferentes tipos de *lasers* tem sido introduzida no tratamento endodôntico pelo efeito bactericida. Contudo, muitos estudos demonstram que este tratamento não provoca a esterilização do canal radicular.<sup>5</sup>

A bactéria *Enterococcus faecalis* é um microrganismo potencialmente capaz de realizar a colonização e proliferação nas infecções dos canais radiculares, sendo bastante prevalente em periodontite apical pós-tratamento. A patogenicidade do *Enterococcus faecalis* é muito bem documentada.<sup>6,7,8</sup> Inúmeros estudos desenvolveram biofilme utilizando esta bactéria isolada para testar a eficácia de agentes antimicrobianos e do tratamento de canal no interior do canal radicular do dente.<sup>9,10</sup>

A utilização do laser entra na lógica da busca por métodos eficazes de desinfecção do canal radicular do dente. A luz do laser é capaz de atingir áreas inacessíveis por técnicas tradicionais<sup>11</sup>.

Após a criação do primeiro aparelho de laser por Maiman em 1960<sup>12</sup>, utilizando o rubi como material ativador para emitir radiação com comprimento de onda de 694,3 nm, ocorreu um grande avanço científico e tecnológico na medicina e na odontologia. Um dos



primeiros trabalhos para avaliar o efeito do laser na cicatrização de feridas de tecido mole foi realizado por Mester *et al*<sup>13</sup>. Estes autores utilizaram o laser de rubi com comprimento de onda de 694,3 nm e doses de 0,5, 1, 4, 5 e 10 J/cm<sup>2</sup> para irradiar feridas em dorso de ratos e observaram que a dose de 1 J/cm<sup>2</sup> proporcionou significativo estímulo do processo de cicatrização tecidual e apresentou melhores resultados em relação às outras doses utilizadas. Observaram, também, que o aumento do número de irradiações proporcionava cicatrização mais rápida das feridas. Este tipo de laser também foi utilizado por Mester *et al*<sup>14</sup> para o tratamento de pacientes com feridas cutâneas de difícil cicatrização, causadas por distúrbios de circulação e injúrias mecânicas, bem como, decorrentes de tratamento de tumores. Utilizaram doses de 1 J/cm<sup>2</sup>, aplicadas 2 vezes por semana. Algumas lesões cicatrizaram após 2 e 5 semanas e, outras, somente após 8, 10 e 12 semanas de aplicação do laser.

O efeito do feixe do laser no tecido depende das suas propriedades físicas, bem como de seu comprimento de onda, força, duração do pulso e tempo de irradiação. Isto depende das propriedades do tecido irradiado assim como a densidade óptica, estrutura e máxima absorção. O tecido duro do dente é composto de cristais de hidroxiapatita, matriz orgânica e água. A absorção máxima para a hidroxiapatita é 10000 nm e 3000 nm para a água<sup>15</sup>.

A aplicação do laser em endodontia inclui sua utilização para hipersensibilidade dentinária, capeamento pulpar e pulpotomia, esterilização de canais radiculares, modelagem do canal, obturação e apicetomia.

O laser de alta potência causa uma visível redução da quantidade bacteriana, porém podem ocorrer efeitos indesejáveis devido ao aumento de temperatura, tais como: trinca dentária e, até mesmo, injúria do ligamento periodontal, resultando em reabsorção da raiz,

anquiloze e necrose perirradicular do dente<sup>16,17</sup>. Entretanto, estas desvantagens podem ser evitadas com o uso do laser de baixa potência para a ativação de um corante fotossensibilizador, que, por sua vez, pode ter efeito bactericida. Esta técnica de desinfecção por fotoativação (PAD) pode ser realizada com a utilização de um laser infravermelho ou com uma luz vermelho visível. Sistemas utilizando laser de baixa potência com luz vermelha visível associado com corante de cloreto de tolônio são utilizados comercialmente. Pesquisas mostram que a técnica de PAD elimina as espécies de bactérias comumente encontradas na cavidade oral e no interior do biofilme formado no interior do canal radicular.<sup>11</sup>

A crioterapia é um método efetivo de destruição não seletiva tecidual por congelamento. Várias substâncias têm sido usadas como agentes criogênicos. O mais comumente utilizado é o nitrogênio líquido que, em *spray* ou com o auxílio de uma sonda, tem sido usado isoladamente ou em conjunto com outros métodos cirúrgicos no tratamento de diversas patologias bucais.<sup>18</sup>

Existem dois métodos de aplicação do nitrogênio líquido: aberto ou fechado. No primeiro, o criogênio é aplicado diretamente na lesão, por meio de *spray* ou hastes de algodão. Já no segundo, não há contato direto entre o nitrogênio líquido e o tecido a ser destruído.<sup>19</sup>

Quando o *spray* de nitrogênio líquido foi aplicado em cultivos de *Enterococcus faecalis*, os resultados demonstraram uma diminuição significativa no crescimento das mesmas, sugerindo que a crioterapia pode apresentar eficácia na redução destas bactérias.<sup>20</sup>

Com o objetivo de conseguir a máxima redução do número de bactérias no interior do canal radicular, especialmente de *Enterococcus faecalis*, a crioterapia foi testada em diversos protocolos de ativação. O protocolo mais eficaz foi o de três aplicações de 60

segundos seguidos por um tempo de descongelamento de 4 minutos.<sup>20</sup> No entanto, a ação da crioterapia em um biofilme de *Enterococcus faecalis* formado em um modelo de dentes bovinos, a crioterapia foi menos eficaz na remoção do biofilme endodôntico que a irrigação com água destilada<sup>21</sup>. Percebe-se, portanto, que a literatura é conflitante no que concerne a essas técnicas alternativas de limpeza do canal radicular, o que justifica o aprofundamento de suas possibilidades antes de determinar sua viabilidade terapêutica.

Sabe-se que diversos tratamentos são eficazes quanto à ação antimicrobiana, porém novas técnicas estão sendo desenvolvidas e testadas. Este trabalho teve como objetivo testar e comparar a eficácia da ação antimicrobiana da irrigação com hipoclorito de sódio a 2%, da fotoativação a laser e da crioterapia em dentes inoculados por *Enterococcus faecalis*.

## 2. ARTIGO

Evaluation of the antimicrobial action of irrigation with sodium hypochlorite 2%, low-power laser and cryotherapy in teeth inoculated with *Enterococcus faecalis*.

Felippe Lehugeur; José Antônio Poli de Figueiredo; Sílvia Dias de Oliveira; Claiton Heitz

### Abstract

This study tested the antimicrobial action of sodium hypochlorite 2%, low-power laser and cryotherapy. After instrumentation, 39 monoradicular roots were inoculated with *Enterococcus faecalis* (ATCC 2212) for 80 days and divided into 4 groups: 1 – positive control, sodium hypochlorite 2% (n=5), 2 – low-power laser to photoactivated tlonium chloride ( $\lambda = 830$  nm) at 100 mW for 40 s (n=10), 3 – cryotherapy, 40 s with liquid nitrogen (n=10) 4 – used the same protocol in groups 2 and 3, respectively (n=10). The count of colony forming units of *E. faecalis* present in the root canal before and after treatment was performed by seeding the surface of blood agar. The results of the second variation of the log were: group 1 = 0.8296, group 2 = 3.7315, group 3 = 0.8284, group 4 = 1.4727. The results show that the association of the low-power laser to photoactivated tlonium chloride with cryotherapy showed a trend towards greater reduction in bacterial counts in the two treatments given separately. However, sodium hypochlorite 2% was more effective in reducing microorganisms in root canals in comparison with other treatments.

Key words: low-power laser, cryotherapy and *Enterococcus faecalis*

## Introduction

*Enterococcus faecalis* is a microorganism capable of causing potentially endodontic infections, being dominant in apical periodontitis after treatment. The pathogenicity of *E. faecalis* is well documented (1,2,3,4,5). Numerous studies have been developed using this biofilm bacteria to test the effectiveness of antimicrobial agents within the root canal of the tooth (6,7,8).

Irradiation has been introduced in endodontic treatment for bactericidal effect and to improve the ability to reach areas inaccessible by traditional techniques. However, many studies show that different types of lasers have bactericidal effect but are unable to sterilize (9,10). The high-power laser causes a noticeable reduction in bacterial number, but owing to the increase in temperature there may be undesirable effects such as tooth crack and even injury of the periodontal ligament, resulting in root resorption, ankylosis and necrosis periradicular tooth (11,12). However, these disadvantages can be avoided with the use of low-power laser to activation of a photosensitizing dye, which in turn causes a lethal effect on bacteria. The activation of a photosensitizing can be performed with the use of an infrared laser or a red light visible. Systems using low-power laser with visible red light in conjunction with dye Tolonium chloride are used commercially (10).

Cryotherapy is an effective method of non-selective tissue destruction by freezing. Several substances have been used as cryogenic agents, however liquid nitrogen the most commonly used, as spray or with the aid of a probe, and has been used alone or in combination with other surgical methods in treating various oral pathologies (13).

The application of in vitro spray of liquid nitrogen in *E. faecalis* has demonstrated a significant decrease in the growth of these bacteria, suggesting that cryotherapy may show a reduction in these bacteria (14).

It is known that various treatments are effective on the antimicrobial action, but new techniques are being developed and tested. This work was carried out to test and compare the efficacy antimicrobial of irrigation with sodium hypochlorite 2%, low-power laser and cryotherapy in teeth inoculated with *E. faecalis*.

#### Materials and methods

Thirty-nine teeth were obtained from the tooth bank of the Faculty of Dentistry, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul and had their crowns removed using diamond drills (KG Sorensen, Barueri, Brasil). The endodontic treatment was performed in all roots, using the step-back technique, until a file number 60 reached the actual length of work pre-determined. Next, care was taken to reach in excess of 0.5 mm beyond the apical foramen using a file number 15, to rid it of any obstruction. During the instrumentation of root canals, irrigation with a solution of sodium hypochlorite 2% (Iodontosul – Porto Alegre, Brasil) was conducted. Irrigation was performed in a volume of 2 mL of solution at each change of endodontic files. At the end, the smear layer was removed using active irrigation of 2 mL of 17% EDTA, which was filling the canal for 5 min. After, root canals were abundantly irrigated with distilled water and dried with paper cones. Each tooth was fixed in a plastic tube with cyanoacrylate glue (Super bonder, Henkel Ltda, SP, Brazil) to remains upright, with the entry of the root canal facing up, and then placed in a autoclavable polypropylene box (Heathrow, Vernon Hills, IL, USA), which was used for the storage of microtubes (Axygen Genuine Quality-CA-USA). After assembly, the

assembly of the box and tube with the teeth were sterilized in an autoclave (Kavo, Joinville, Brazil) at 121 ° C for 30 min. The sterility of the teeth was assessed using a tooth from each group by introducing a sterile paper cone inside the canal to make the collection of possible contaminants. This cone was immediately inoculated into sterile saline 0.85%, homogenized and incubated at room temperature for 5 min. After this period, an aliquot of 100 mL of saline containing the cone was seeded on the surface of blood agar and incubated for 18 to 24 h at 37 °C. The tooth used to perform the control of sterilization was not used for further research.

*E. faecalis* ATCC 2212 was grown in BHI (Brain Heart Infusion) for 24 h at 37 °C in a bacteriological incubator. Each tooth was infected with  $6.2 \times 10^7$  CFU of *E. faecalis* by inoculating 100 mL of the cultivation of this organism.

The 35 teeth were inoculated with 100 mL of the cultivation of *E. faecalis* within the root canal. After this procedure, sterile BHI was added to the microtube until it was completely filled with culture medium. The cultivation of *E. faecalis* was maintained for 80 days for biofilm formation, with the renewal of one third of the volume of BHI broth every 3 days. All teeth manipulation was performed under aseptic conditions.

Next, the teeth were detached from tubes and placed in a wax base that served to prevent the liquid introduced into the root canal by foramen. The groups were divided as follows:

Group 1 - Positive control: irrigation sodium hypochlorite 2% (n = 5);

Group 2 - Low-power laser to activation of a photosensitizing dye (n = 10);

Group 3 - Cryotherapy (n = 10);

Group 4 - Photoactivated disinfection followed by cryotherapy (n = 10).

Before the treatments were made, the canal was completed without mechanical stirring with distilled water. After, with a file number 08, the liquid was agitated. Then a sterile paper cone was introduced for 15 s inside the root canal. This cone was inoculated into a tube containing sterile saline solution 0.85%. The material was homogenized and then serially diluted to  $10^{-3}$ . Aliquots of 100  $\mu$ L of saline containing the cone and the dilutions were plated on the surface of blood agar, in duplicate, with the aid of a Drigalsky handle, and incubated for 18 to 24 h at 37 °C. After the incubation period, colony forming units (CFU) of the plates presenting between 15 and 150 colonies were counted.

In Group 1, irrigation was performed with sodium hypochlorite 2% for 60 s by opening the root canal followed by aspiration of the irrigated content. In group 2, trolonium chloride was introduced, and shortly thereafter the irradiation with a low-power laser ( $\lambda = 830\text{nm}$ ) of the DMC brand theralase (São Paulo, SP, Brazil) was performed for 40 s on at 100 mW. In group 3, liquid nitrogen was applied through the cryostat CRY-AC® -3 with the aid of a disposable needle of 0.7 mm in diameter and 25 mm long with Luer Lock. In group 4, there was an association of the procedures used for group 2 and group 3.

Following these procedures, a sterile paper cone #40 was introduced for 15s inside the root canal until it reached the actual length of employment., in each tooth. This cone was immediately inoculated into a tube containing sterile saline solution 0.85%, and the material was homogenized and diluted to  $10^{-3}$ . After the treatments, we used the same procedures for counting the number of CFU as described above. After the incubation period, CFU of the plates presenting between 15 and 150 colonies were counted.

The SPSS version 16.0 was used for statistical analysis. We described the variable numbers of microorganisms in the median and minimum and maximum values. Values were  $\log_{10}$  transformed to describing the means and standard deviation. To compare the



means of logarithms, we used the ANOVA and the Tukey post hoc test. To compare the evolution in time between the two groups, we used analysis of variance for repeated measures. The level of significance was 5%.

## Results

Sterility of teeth was confirmed by the absence of bacterial growth from the material collected from the root canal of teeth used for the control of sterilization.

Cryotherapy and curing the low-power laser did not provide a significant bacterial reduction in root canal when compared to measurements obtained before and after treatment. However, in the group that was associated with these two techniques was a reduction of more than one log<sub>10</sub> in the amount of microorganisms present in root canal.

Table 1 shows that cryotherapy and curing the low-power laser showed a reduction in the number of microorganisms was 0.82 log<sub>10</sub> CFU / mL, while the combination of these two techniques showed a reduction of 1.47 log<sub>10</sub> CFU / mL.

Table 1. Average and medians of the variables of the logarithms of the variable in the pre-treatment and post-treatment.

	Low-power laser	Sodium hypochlorite 2% (n=5)	Cryotherapy (n=10)	Low-power laser+ cryotherapy (n=10)
	Pre* Post	Pre* Post	Pre* Post	Pre* Post
Variable	72,000	58,000	42,000	57,000
Median	7,900	10	7,500	1,600
(minimum - maximum)	(4,900- 1,380- 142,000) 72,000)	(27,000- 10- 800,000) 100)	(12,000- 930- 160,000) 39,000)	(9,900- 210- 127,000) 10,600)

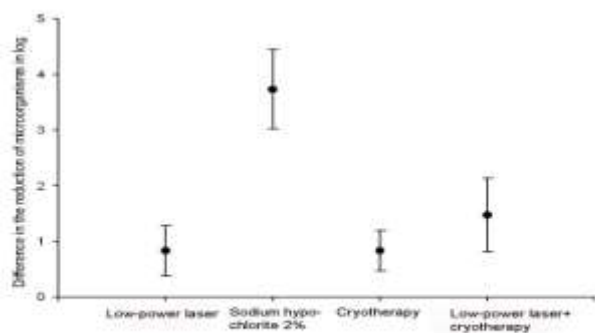
Log Variable (mean + standard deviation)	4.74 ± 0.48	4.93±0.58	4.61±0.28	4.66±0.37
	3.91± 0.54	1.20±0.44	3.79±0.49	3.18±0.56
Difference	0.82±0.45 a	3.73±0.71 b	0.82±0.36 a	1.47±0.66 a

\* The average of the logarithms of the variable in the pre-treatment was observed (p = 0.160 - ANOVA)

a, b = same letters represent equal means and different letters represent means statistically different (p <0.01)

Figure 1 illustrates, as means and standard deviations, the effectiveness in reducing *E. faecalis* in root canals of curing a low-power laser, cryotherapy and the association of these two treatments compared with the action of sodium hypochlorite 2%, showing that none of the treatments used in this study was able to sterilize the root canal, but the reduction obtained with the use of sodium hypochlorite was significantly higher when compared to other treatments

Fig 1. Means and standard deviations in the logarithm in base ten treatments



## Discussion

One of the functions of the endodontic treatment is the disinfection of the root canal. Thus, some treatments have been tested for the sterilization of root canal during endodontic treatment is achieved (15), while no damage to structures caused by dental treatments.

Unlike the high-power laser, the low-level laser does not cause a rise in temperature inside the root canal, which avoids damage to dental structures. However, the results of this study showed that such treatment was not effective in reducing *E. faecalis* within the root canal. It is believed that only one application of low-power laser is not sufficient to achieve the photosensitization of the dye. Or, perhaps, the power used in this study was not enough to photosensitize the dye.

Cryotherapy affords a low reduction in *E. faecalis* counts, like low-power laser to activation of a photosensitizing dye. In the specialized literature, the most commonly used method consists of three 40-s cycles. However, in this study we used only one 40-s application, because the temperature decrease caused by liquid nitrogen can cause necrosis of soft tissue and bone, and damage to the dental structures (16,17,18,19). Therefore, we tried to shorten the application to avoid such damage. However, the low reduction in bacterial counts from root canal may be imputable to the method used in this study.

Because there is no report in the literature, this study tested the association of low-power laser to activation of a photosensitizing dye and cryotherapy in the root canal. The application time of cryotherapy was reduced to prevent further damage to tooth tissue. The results may be seen as satisfactory because the technique promoted a greater reduction in *E. faecalis* counts present in the root canal, when compared with the two treatments given separately. However, only one application of low-power laser and cryotherapy were not sufficient to obtain a bacterial reduction similar to that obtained with the use of hypochlorite and 2% for the root canal. However, it should be noted that sodium hypochlorite causes irritation of the tissue apical tooth and causes severe damage in contact with the soft tissue. It is believed that increasing the strength and number of applications of low-power laser is sufficient to reduce bacterial counts to a satisfactory extent. However,

the increase in the number of applications of liquid nitrogen can increase the risk of damage to tooth structure, soft tissue and bone.

This study presented the possibility of an association of two previously described methods as an alternative to using each one separately, since it shows a trend towards greater bacterial reduction within root canal using the combined method. However, a greater number of applications and higher-power laser to activation of a photosensitizing dye can be tested for the sterilization of root canal. This would avoid the failure of endodontic treatment in the long run.

#### Bibliography

1. Peciuliene, V et al. Isolation of *Enterococcus faecalis* in previously root-filled canals in a Lithuanian population. *J Endodon* 2000;26;593-5.
2. Sjogren, U et al. Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* 1997; 30 ; 297-306.
3. Bystrom, A; Sundqvist G. The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. *Int Endod J* 1985;18;35– 40.
4. Siren, EK, Haapasalo MP, Ranta K, Salmi P, Kerosuo EN. Microbiological findings and clinical treatment procedures in endodontic cases selected for microbiological investigation. *Int Endod J* 1997;30:91–5.
5. Hancock HH 3rd; Sigurdsson A; Trope M; Moiseiwitsch J. Bacteria isolated after unsuccessful endodontic treatment in a North Am population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001;91:579–86.

6. Estrela, C; Sydney, GB; Figueiredo, JAP; Estrela, CRA. A model system to study antimicrobial strategies in endodontic biofilm. *Journal of Applied Oral Science* 2009; 17(2);87-91.
7. Gutknecht N; Franzen R; Schippers M; Lampert F. Bactericidal effect of a 980-nm diode laser in the root canal wall dentin of bovine teeth. *J Clin Laser Med Surg* 2004;22:9 –13.
8. Lee MT; Bird PS; Walsh LJ. Photo-activated disinfection of the root canal: a new role for lasers in endodontics. *Aust Endod J* 2004;30:93– 8.
9. Blum, JY; Michailesco, P; Abadie, MJ; An evaluation of the bactericidal effect Nd:YAG laser. *J Endodon* 1997; 23; 583-5.
10. Meire, MA ET AL. Effectiveness os different laser systems to kill *Enterococcus faecalis* in aqueous suspension and in an infected tooth model. *International Endodontic Journal* 2009; 42; 351-9.
11. Lin, CP et al. Phase, compositional, and morphological changes of human dentin after Nd:YAG laser treatment. *J Endodon* 2001; 27; 389-393.
12. Lan, W. Temperature elevation on the root surface during Nd:YAG laser irradiation in the root canal. *J. Endodon* 1999; 25; 155-156.
13. Schimdt, BL; Pogrel, MA. Neurosensory changes after liquid nitrogen cryotherapy. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 2004; 62; 1183-7.
14. Batista PS. Análise do efeito do spray de nitrogênio líquido em culturas de bactérias *Enterococcus faecalis* – estudo in vitro. Tese de doutoramento. Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2006.
15. Souza-Gugelmin, M. C. Et al. Estudo da ação antimicrobiana dos lasers de Nd:yag, Co2 e er:yag, na descontaminação de limas endodônticas. *Rev odont univ ribeirão Preto* 2001;v. 4; n. 1; 15-9.

16. Borges HOI. Uso clínico de crioterapia com nitrogênio líquido no tratamento de hiperplasia bucal. Dissertação de mestrado. Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2005.
17. Santos AMB; Sant'ana Filho M. Análise macroscópica do efeito de diferentes protocolos de nitrogênio líquido sobre a mucosa bucal: estudo em ratos. Rev Fac. Odontol. Porto Alegre 2002; 43(2): 18-23.
18. Scortegagna A, Sant'ana Filho M. Análise microscópica de enxerto ósseo autógeno em mandíbula de coelhos submetidos à crioterapia com nitrogênio líquido. Odonto Ciência 2004; 19(46): 332-7.
19. Silva FM. Estudo das características histológicas do processo de reparo após aplicação de nitrogênio líquido em tecido ósseo em mandíbulas de coelhos. Tese de doutoramento. Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2003.

### 3.DISCUSSÃO

A principal função do tratamento endodôntico é a desinfecção do canal radicular. Entretanto, a complexidade morfológica do canal radicular dificulta os tratamentos endodônticos<sup>22</sup>. Estudos relatam que a falha do tratamento endodôntico deve-se aos microrganismos que persistiram no canal radicular<sup>23,24</sup>. Sjogren et al relatam que o dente a partir do qual foi possível o isolamento bacteriano no momento... no momento da obturação do canal radicular tem 68% de sucesso, enquanto o dente em que não foi possível o isolamento bacteriano tem um sucesso de 94% no período de 5 anos<sup>24</sup>.

O *E. faecalis* é uma bactéria anaeróbia facultativa comensal Gram-positiva do trato intestinal e um patógeno oportunista que já foi detectada nos 5 mm apicais do canal radicular<sup>25</sup>

Conseguir a esterilização do canal radicular tem sido a razão de inúmeras pesquisas desenvolvidas. Neste estudo foram testados a crioterapia, fotoativação a laser de baixa potência e o hipoclorito de sódio a 2% em raízes monorradiculares inoculadas com *E. faecalis*.

A crioterapia é uma técnica utilizada para realizar a desinfecção do canal radicular. Neste trabalho, não houve redução significativa do número de bactérias após o congelamento com nitrogênio líquido. Porém, foi realizado apenas um ciclo de crioterapia, enquanto que na literatura está comprovado que é necessária a aplicação de dois a três ciclos para conseguir uma redução de microrganismos satisfatória. Entretanto, os danos causados a estrutura dentária, tecidos moles e osso são eminentes devido à extensa diminuição da temperatura causada pela crioterapia. Portanto, quanto mais aplicações forem realizadas, maior a chance de lesar os tecidos responsáveis pela manutenção do

elemento dentário no alvéolo<sup>26,27</sup>.

A fotoativação do corante de cloreto de tolônio com o laser de baixa potência é outro tratamento testado para descontaminar o canal radicular. Nesta pesquisa, este tratamento não obteve um resultado satisfatório. Estatisticamente obteve resultado semelhante ao da crioterapia. O número, o tempo e a potência das aplicações podem ter influenciado na baixa eficácia deste procedimento. O laser de baixa potência não proporciona grandes variações de temperatura podendo, assim, ser realizadas um maior número de aplicações e potência para que haja uma maior redução do número de bactérias do interior do canal radicular.

Neste estudo, testou-se a associação da crioterapia e da fotoativação a laser de baixa potência. Na literatura não existe relato da associação destas duas técnicas. O resultado obtido foi satisfatório, uma vez que proporcionou a redução do número de bactérias presentes no interior do canal radicular em comparação às duas técnicas utilizadas separadamente. Porém, em comparação ao hipoclorito de sódio, este procedimento não apresentou a mesma eficácia. O aumento do número de aplicações e da potência do laser de baixa potência poderia levar a resultados mais satisfatórios desta técnica.

O melhor tratamento empregado neste trabalho foi o hipoclorito de sódio a 2%. A eficácia deste tratamento já está comprovada na literatura, o que corrobora com os resultados obtidos neste trabalho, sendo o método mais aconselhável para ser utilizado na desinfecção do canal radicular. Entretanto, não houve 100% da redução das bactérias presentes no interior do canal radicular. Portanto, novos métodos devem ser testados para que isto seja possível. Porém, deve-se evitar tratamentos que causem danos a estrutura dentária.



#### 4. BIBLIOGRAFIA

1. DE UZEDA, M. Participação microbiana nas infecções da polpa dental e do periápice. **In: Microbiologia Oral: Etiologia da cárie, doença periodontal e infecção endodôntica. Rio de Janeiro: MEDSI. p. 89-100. 2002.**
2. BAUMGARTNER, J. C.; FALKLER, W. A. Bacteria in the apical 5 mm on infected root canals. **J Endod.**, v. 17, n. 8, p. 380-383, aug. 1991.
3. CZONSTKOWSKY, M.; WILSON, E.G.; HOLSTEIN, F.A. The smear layer in Endodontics. **Dent. Clin. North Am.**, v. 34, n.1, p.13-25, 1990.
4. GARBEROGLIO, R.; BECCE, C. Smear layer removal by root canal irrigation. **Oral Surgery**, v.78, n.3, p.359-367, 1994.
5. BLUM, J.Y.; MICHAILESCO, P.; ABADIE, M.J.; An evaluation of the bactericidal effect Nd:YAG laser. **J Endodon**, v.23, p.583-585, 1997.
6. PECIULIENE, V. et al. Isolation of *Enterococcus faecalis* in previously root-filled canals in a Lithuanian population. **J Endodon**, v. 26, n. 10, p. 593-595, 2000.
7. IZUMI, É.; PIRES P.D.; MARQUES E.B; SUZART S.; Hemagglutinating and hemolytic activities of *Enterococcus faecalis* strains isolated from different human clinical sources. **Research in Microbiology**, v. 156, issue 4, p.583-7, 2005.
8. FIGDOR D, DAVIES JK, SUNDQVIST G. Starvation survival, growth, and recovery of *Enterococcus faecalis* in human serum. **Oral Microbiol Immunol.**, v.18, p. 234-9, 2003.

9. ESTRELA, C.; SYDNEY, G.B.; FIGUEIREDO, J.A.P; ESTRELA, C.R.A. A model system to study antimicrobial strategies in endodontic biofilm. ***Journal of Applied Oral Science***, v. 17(2), p.87-91, 2009.
10. WANG Q.; ZHANG C.; YIN X. Evaluation of the Bactericidal Effect of Er,Cr:YSGG, and Nd:YAG Lasers in Experimentally Infected Root Canals. ***Journal of Endodontics***, v..33, p. 830-2, 2007.
11. MEIRE, M.A. ET AL. Effectiveness os different *laser* systems to kill *Enterococcus faecalis* in aqueous suspension and in an infected tooth model. ***International Endodontic Journal***, v. 42, p.351-359, 2009.
12. 8. MAIMAN, T. Stimulated optical radiation in ruby. ***Nature***, v. 187, p. 493-494, 1960.
13. MESTER, E.; SPIRY, T.; SZENDE, B.; TOTA, J.G. Effect of *laser* rays on wound healing. ***American Journal of Surgery***, v.122, p. 532-535, 1971.
14. MESTER, E.; JASZSAGI-NAGY, E. The effect of *laser* radiation on wound healing and collagen synthesis. ***Studia Biophysics***, v. 35, p. 227-230, 1973.
15. KELLER, U.; HIBST, R. Experimental studies of the application of the Er:YAG *laser* on dental hard substances (II). Light microscopic and SEM investigations. ***Lasers in Surgery and Medicine***, v. 9, p. 345–351, 1989.
16. LIU, H.C.; LIN, C.P.; LAN, W. H. Sealing depth of Nd:YAG *laser* on human dentinal tubules. ***Journal of Endodontics***, v. 23, p.691–69, 1997.
17. ROONEY, J.; MIDD A.; LEEMING, J. A laboratory investigation of the bacterial effect of a Nd:YAG *laser*. ***Br Dent J.***, v. 176, n. 2, p. 61-64, jan. 1994.

18. GUTKNECHT, N. et al. Bactericidal effect of the Nd:YAG *laser* in vitro root canals. ***J Clin Laser Med Surg.***, v. 14, n. 2, p. 77-80, apr. 1996b.
19. BERKITEN, M.; BERKITEN, R.; OKAR, I. Comparative evaluation of antibacterial effects of Nd:YAG *laser* irradiation in root canals and dentinal tubules. ***J Endodon.***, v. 26, n. 5, p. 268- 270, may. 2000.
20. LIN, C.P et al. Phase, compositional, and morphological changes of human dentin after Nd:YAG *laser* treatment. ***J Endodon***, v.27, p.389-393, 2001.
21. LAN, W. Temperature elevation on the root surface during Nd:YAG *laser* irradiation in the root canal. ***J. Endodon***, v. 25, n.3, p.155-156, 1999.
22. BYSTROM A, SUNDQUIST G. The antibacterial action of sodium hypochloride and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. ***Int Endod J.***, v. 18, p. 35-40, 1985.
23. MOLANDER A, REIT C, DAHLEN G, KVIST T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. ***Int Endod J.***, v.31, p. 1-7, 1998.
24. SJOGREN U, FIGDOR D, PERSSON S. SUNDQVIST G. Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. ***Int Endod J***, v. 30, p. 297-306, 1997.
25. KRISTICH C.J., MANIAS D.A., DUNNY G.M., Development of a Method for Markerless Genetic Exchange in *Enterococcus faecalis* and Its Use in Construction of a *srtA* Mutant. ***Applied and Environmental Microbiology***, v. 71, n.10, p.5837-5849, 2005.
26. BORGES HOI. **Uso clínico de crioterapia com nitrogênio líquido no tratamento de hiperplasia bucal.** Dissertação de mestrado. Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2005.

27. SANTOS AMB, SANT'ANA FILHO M. Análise macroscópica do efeito de diferentes protocolos de nitrogênio líquido sobre a mucosa bucal: estudo em ratos. **Rev Fac. Odontol. Porto Alegre**, v. 43, n.2, p.18-23, 2002.

## ANEXO A

Figura da placa de agar sangue com número de unidades formadoras de colônias entre 15 e 150.



## ANEXO B

## GRUPO 1 – HIPOCLORITO DE SÓDIO A 2%

<i>Dente</i>	<i>Pré-tratamento</i>	<i>Pós-tratamento</i>	<i>deltalog</i>
1	4,76	1,00	-3,76
2	4,57	1,00	-3,57
3	4,99	2,00	-2,99
4	4,43	1,00	-3,43
5	5,90	1,00	-4,90

## GRUPO 2 – FOTOATIVAÇÃO A LASER DE BAIXA POTÊNCIA

<i>Dente</i>	<i>Pré-tratamento</i>	<i>Pós-tratamento</i>	<i>deltalog</i>
1	4,78	4,30	-0,48
2	5,03	3,90	-1,13
3	3,69	3,14	-0,55
4	5,15	4,52	-0,63
5	5,05	3,96	-1,09
6	4,85	3,89	-0,96
7	4,08	3,76	-0,32
8	5,10	4,86	-0,25
9	4,86	3,61	-1,25
10	4,84	3,20	-1,63


## GRUPO 3 – CRIOTERAPIA

<i>Dente</i>	<i>Pré-tratamento</i>	<i>Pós-tratamento</i>	<i>deltalog</i>
1	4,66	4,03	-0,63
2	4,58	3,41	-1,17
3	4,68	3,60	-1,08
4	4,68	4,59	-0,09
5	4,76	3,86	-0,90
6	4,48	3,89	-0,59
7	4,51	3,92	-0,59
8	4,08	2,97	-1,11
9	4,56	3,26	-1,30
10	5,20	4,38	-0,82

## GRUPO 4 – FOTOATIVACÃO A LASER DE BAIXA POTÊNCIA + CRIOTERAPIA

<i>Dente</i>	<i>Pré-tratamento</i>	<i>Pós-tratamento</i>	<i>deltalog</i>
1	5,09	3,73	-1,36
2	4,89	2,53	-2,36
3	4,95	2,66	-2,29
4	4,36	3,30	-1,06
5	4,00	2,32	-1,67
6	4,32	3,58	-0,74
7	5,10	3,00	-2,10
8	4,40	4,03	-0,37
9	4,76	3,08	-1,68
10	4,75	3,66	-1,09

## ANEXO C



*Comissão Científica e de Ética  
Faculdade da Odontologia da PUCRS*

---

Porto Alegre 28 de outubro de 2009

**O Projeto de:** Dissertação

Protocolado sob n°: 0040/09

**Intitulado:** Avaliação do efeito antimicrobiano da irrigação com hipoclorito de sódio a 2% da fotoativação a laser e da crioterapia em dentes inoculados com enterococcus faecalis

**Pesquisador Responsável:** Prof. Dr. Cláiton Heitz

**Pesquisadores Associados:** Felipe Lehugeur

**Nível:** Mestrado

Foi **aprovado** pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da PUCRS em 28 de outubro de 2009.

*Este projeto deverá ser imediatamente encaminhado ao CEP/PUCRS*



**Prof. Dr. Eraldo Luiz Batista Júnior**  
Presidente da Comissão Científica e de Ética da  
Faculdade de Odontologia da PUCRS


---

Av. Itália, 6681, Prédio 06 sala 209  
Porto Alegre /RS - Brasil - Cx. Postal:1429  
90619-900

Fone/Fax: (51) 3320-3338  
e-mail: odontologia-cep@pucrs.br



## ANEXO D



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

OF.CEP-1638/09

Porto Alegre, 07 de dezembro de 2009.


Senhor Pesquisador,

O Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa registro CEP 09/04874 intitulado **"Avaliação do efeito antimicrobiano da irrigação com hipoclorito de sódio a 2%, da fotoativação a laser e da crioterapia em dentes inoculados com *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. Claiton Heitz  
Faculdade de Odontologia  
Nesta Universidade

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