

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

NÍVEL: DOUTORADO

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: ENDODONTIA

PERIODONTITE APICAL INDUZIDA EM DENTES DE CÃES: AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DA ENDODONTIA EM SESSÃO ÚNICA EMPREGANDO-SE STERIOX E HIPOCLORITO DE SÓDIO, ASSOCIADOS OU NÃO À TERAPIA FOTODINÂMICA, E ACURÁCIA DOS EXAMES RADIOLÓGICO, TOMOGRÁFICO E HISTOLÓGICO NO SEU DIAGNÓSTICO

FERNANDA ULLMANN LOPEZ

PORTO ALEGRE

2014

Fernanda Ullmann López

PERIODONTITE APICAL INDUZIDA EM DENTES DE CÃES: AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DA ENDODONTIA EM SESSÃO ÚNICA EMPREGANDO-SE STERIOX E HIPOCLORITO DE SÓDIO, ASSOCIADOS OU NÃO À TERAPIA FOTODINÂMICA, E ACURÁCIA DOS EXAMES RADIOLÓGICO, TOMOGRÁFICO E HISTOLÓGICO NO SEU DIAGNÓSTICO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, como requisito para obtenção do título de Doutor em Odontologia, na área de concentração de Endodontia.

Orientadora: Profa. Dra. Fabiana Vieira Vier Pelisser

Co-orientadora: Profa. Dra. Patrícia Maria Poli Kopper Móra

PORTO ALEGRE

2014

Agradecimentos

Aos meus pais **Adalberto e Maria Inês**, meus eternos exemplos de vida! Tento traduzir em palavras toda gratidão e amor que sinto. Vocês que guiaram meus primeiros passos e souberam me conduzir ao longo da vida até o que sou. Essa grande conquista em minha vida dedico a vocês que me deram educação, que me ensinaram valores como honestidade, generosidade, companheirismo, amizade, perseverança, firmeza e, acima de tudo, foram pais de um amor incondicional.

Ao meu companheiro **Fabio**, meu amor e companheiro de todas as horas! Obrigada por todo amor, amizade, cuidado, e, principalmente, por compreender minhas ausências e me incentivar nessa jornada! Você me ajudou a superar este desafio! Essa vitória é nossa!

Aos meus irmãos **Laura e Fabio**, por tudo que passamos juntos, brincadeiras, alegrias e dificuldades. Em todas essas horas soubemos o que a palavra família significa e permanecemos unidos e fortes nos momentos difíceis. Também dedico a vocês dois, meus grandes amigos, essa vitória em minha vida.

As minhas orientadoras e amigas, **Fabiana e Patrícia**, pelo imenso empenho pelo sucesso deste estudo! Obrigada pela disponibilidade, pelo aprendizado e acima de tudo pela amizade! Pelo companheirismo ao estar ao meu lado em Passo Fundo, enfrentando a sempre longa jornada de trabalho e nas longas horas de estatística! Obrigada pelo incentivo incessante nestes 4 anos. Muito, muito obrigada por terem estado ao meu lado!

Aos professores **José Figueiredo e Álvaro Della Bona**, por todo empenho e pela oportunidade de concretização desta pesquisa. Obrigada pelo apoio, amizade e exemplo de profissionalismo!

A colega e amiga **Carolina** que foi minha “fiel escudeira”! Minha companheira das longas horas de trabalho! Quanto empenho! Que boas risadas demos! Obrigada por ter trabalhado comigo!

`A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram e fizeram parte desta minha longa jornada de estudos na construção do conhecimento desde a época da Faculdade. Muito obrigada por fazerem parte da minha vida!

Me considero uma pessoa muito rica, pois tenho em minha vida uma **família maravilhosa, muitos amigos do coração e mestres verdadeiros**. Somente sou o que sou hoje porque vocês fazem parte da minha vida! Obrigada por estarem sempre ao meu lado!

RESUMO

A persistência de infecção no interior do sistema de canais radiculares constitui um dos principais fatores responsáveis pelos insucessos endodônticos. A complexidade da anatomia interna dos canais dificulta sua eliminação completa pelas técnicas de preparo atuais. Diante desta realidade, protocolos alternativos de desinfecção, abrangendo meios químicos e terapia fotodinâmica (PAD), têm sido pesquisados. Nessa pesquisa, 10 cães foram divididos aleatoriamente em dois grandes grupos (n=5): submetidos ou não à PAD. Os canais dos dentes pré-molares superiores e inferiores de cada cão foram distribuídos nos subgrupos experimentais: SX (Sterilox 400ppm), H2 (hipoclorito de sódio (NaOCl) 2%), H5 (NaOCl 5%) e controle: C+ (controle positivo: soro fisiológico) totalizando uma amostra de 134 canais radiculares. Os dentes dos grupos experimentais e do grupo C+ foram abertos e os canais foram deixados expostos ao ambiente oral por 15 dias. Após o selamento das cavidades, aguardaram-se 60 dias, objetivando-se a indução de periodontite apical (PA). Os canais foram preparados de acordo com cada protocolo de desinfecção proposto e obturados na mesma sessão. Decorridos 120 dias, os cães foram mortos, sendo realizados os seguintes procedimentos: radiografias periapicais (PR), para mensuração das áreas das PAs; tomografias computadorizadas por feixe cônico (TCFC), para mensuração das áreas e dos volumes das PAs; microscopia óptica, para avaliação dos eventos inflamatórios periapicais. Com base na coleta desses dados, o experimento foi dividido em 2 artigos. O primeiro realizou uma avaliação histológica da endodontia em sessão única de dentes de cães com PAs utilizando as soluções irrigadoras Sterilox 400ppm e NaOCl nas concentrações de 2% e 5%, associados ou não à PAD, O processo inflamatório periapical foi categorizado em escores, de acordo com a intensidade. Os

dados foram coletados e analisados estatisticamente com os testes Kruskal-Wallis e Mann-Whitney ($\alpha = .05$). A PAD não apresentou efeito significativo sobre o processo inflamatório periapical quando utilizada após o preparo químico-mecânico (PQM). As soluções irrigadoras H5, H2 e SX do grupo sem PAD apresentaram diferenças estatísticas do grupo C+ ($P = .02$). O grupo SX não apresentou diferenças significativas dos grupos H5 e H2 assim como o grupo SX/PAD dos grupos H5/PAD and H2/PAD. Este estudo mostrou que o emprego da PAD não apresentou relevância clínica nos resultados da endodontia de dentes com necrose pulpar associados a PA. A solução de Sterilox 400ppm pode ser considerada como um irrigante alternativo ao NaOCl no tratamento endodôntico. O segundo artigo avaliou a correlação e a concordância existentes entre as medidas da PA, fornecidas pela PR (área) e pela TCFC (área e volume), correlacionando com seu correspondente histológico. A correlação entre os métodos foi avaliada por meio do coeficiente de Person e a concordância pelo método de Bland-Altman (BA). Os resultados demonstraram que, apesar de uma forte correlação entre as medidas das áreas obtidas na PR e na TCFC, os limites de concordância se apresentaram muito amplos (95%: 0.19 a 1.08). A PR mensurou em média apenas 63% do valor da área da TCFC. De acordo com o método de BA, apesar da forte correlação entre a área da PR e o volume da TCFC, quanto maior o volume da PA na TCFC, mais subestimado é o seu tamanho pela PR. Quando as PAs apresentaram volumes menores de 6 mm^3 , a estimativa dos valores da TCFC pela PR foram imprevisíveis. A correlação da área da PR, área da TCFC e volume da TCFC com os dados histológicos foi significativa. Em conclusão, o diagnóstico da PA baseado em dados radiográficos é clinicamente limitado e não deveria ser usado para investigações científicas.

Palavras-chave (DeCS): periodontite apical, diagnóstico, endodontia, radiografia, tomografia, microscopia óptica, hipoclorito de sódio

ABSTRACT

The persistence of infection within the root canal system is one of the main factors responsible for endodontic failures. The complexity of the internal anatomy of root canals prevents its complete removal by current instrumentation techniques. Thus, alternative disinfection protocols, including irrigating solutions and photo-activated therapy (PAD), have been assessed. In this study, 10 dogs were randomly divided into two groups (n= 5): with and without PAD. The canals of upper and lower premolars of each dog were distributed in the experimental subgroups: SX (400ppm Sterilox), SH2 (2% sodium hypochloride (NaOCl)), SH5 (5% NaOCl) and C+ (positive control: saline solution) in a total sample of 134 root canals. Teeth of the experimental and C+ groups were opened and the canals were left exposed to the oral environment for 15 days and then sealed for apical periodontitis (AP) induction. After 60 days, the root canals were treated in accordance with each disinfection protocol proposed and filled in the same session. After 120 days, the dogs were euthanized and the following procedures were carried out: periapical radiography (PR), to measure the AP area; cone beam computed tomography (CBCT), to measure the AP area and volume; light microscopy, to evaluate inflammatory periapical events. Based on the collected data, the study was divided into two papers. The first carried out an histological evaluation of a single visit root canal treatment of dog's teeth with AP using 400ppm Sterilox, 2%NaOCl and 5%NaOCl, with and without PAD. Scores were given according to the intensity of inflammatory infiltrate. Data was collected and analyzed statistically with Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests ($\alpha = .05$). The PAD did not produce significant differences in the scores for apical inflammation when used after chemo-mechanical preparation. The irrigating solutions SX, SH2 and SH5 without PAD were statistically different from C+ ($P=02$) that presented

the greatest scores for apical inflammation. SX group could be statistically compared to SH5 and SH2 groups as SX/PAD could be compared to SH5/PAD and SH2/PAD. In conclusion, PAD did not show any clinical relevance for the treatment of root canal with pulpal necrosis and AP. The 400 ppm Sterilox may be considered an irrigating solution alternative to NaOCl in root canal treatment. The second paper investigated the correlation and agreement between PR (area) and CBCT (area and volume) data, correlating with the corresponding histopathological data. The correlation between methods was evaluated by Pearson's coefficient and Bland-Altman's (BA) method was used to assess the agreement between PR and CBCT data. The results showed that, despite a strong correlation between PR and CBCT areas, the limits of agreement were very broad (95%: 0.19 to 1.08). PR only measured on average 63% of CBCT values. Although the strong correlation between PR area and CBCT volume, BA suggests that the larger the CBCT volume the more underestimated the PR value. When APs had volumes smaller than 6 mm³, the PR estimates of CBCT data were unpredictable. The correlation between PR area, CBCT area, CBCT volume and histology data was significant. In conclusion, the diagnosis of AP based on PR data is clinically limited and it should not be used for scientific investigations.

Keywords (DeCS): periapical periodontitis, diagnosis, endodontics, radiography, tomography, microscopy, sodium hypochlorite

SUMÁRIO

1. Introdução.....	12
1.1 Hipoclorito de Sódio.....	14
1.2 Sterilox.....	17
1.3 Terapia Fotodinâmica.....	21
1.4 Radiografia Periapical & Tomografia Cone Beam no diagnóstico das periodontites apicais.....	30
2.Objetivos.....	36
3. Capítulo I.....	37
4. Capítulo II.....	59
5. Discussão.....	81
6. Conclusões.....	94
7.Referências.....	95
8. Anexos.....	105

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

cm - centímetro

dpi - “dots per inch”

EDTA – Ácido Etileno Diamino Tetra Acético

G – gauge

Hz - hertz

J – jaule

Kg – quilograma

KVp - kilovoltagem pico

MEV – microscopia eletrônica de varredura

mA - miliampere

mg - miligrama

mm – milímetro

mL – mililitro

mV – milivolt

mW- miliwatt

nm - nanômetro

ppm - parte por milhão

r – coeficiente de correlação

s - segundo

µg – micro

grama

µm – micrômetro

W - watt

∞ - alfa

< - menor

> - maior

% - por cento

1. Introdução

Os microrganismos constituem os agentes etiológicos primários no desenvolvimento das patologias periapicais (KAKEHASHI, STANLEY & FITZGERALD, 1965). Beneficiados pela anatomia dos canais radiculares, encontram-se fora do alcance dos mecanismos de defesa do hospedeiro e antibioticoterapia sistêmica. Sua eliminação depende da intervenção do profissional por meio do preparo químico-mecânico (PQM).

Em dentes com polpas necróticas e portadores de periodontite apical (PA), foram encontrados microrganismos em todo o sistema de canais, incluindo o canal principal, canais laterais, acessórios e secundários, túbulos dentinários, delta e forame apicais, regiões de reabsorções no cimento e tecidos periapicais (BYSTROM *et al.*, 1987; NAIR *et al.*, 1990). Nesses casos, também foi demonstrada a presença microbiana em regiões extrarradiculares, constituindo mais um possível fator responsável pela perpetuação do processo infeccioso nos tecidos periapicais (TRONSTAD, BARNETT & CERVONE, 1990).

A polpa necrótica constitui um meio favorável para a proliferação microbiana devido à presença de matéria orgânica em decomposição que funciona como substrato para sua nutrição. Visando erradicar a microflora do canal radicular, a terapia endodôntica promove uma alteração marcada neste meio. Nesse processo, a maioria dos microrganismos é eliminada. Contudo, nos casos de necrose pulpar associada a PAs, o índice de infecções persistentes ou refratárias ainda é elevado (NAIR *et al.*, 2005). Estudos têm demonstrado que a principal causa de insucesso é a persistência

microbiana na região apical de canais obturados, causada tanto pela localização em regiões não acessíveis a instrumentação e irrigação ou mesmo pela organização em biofilmes (NAIR *et al.*, 1990; SJOGREN *et al.* 1997; MOLANDER *et al.* 1998; LEONARDO *et al.*, 2002; NAIR *et al.*, 2005; SIQUEIRA & ROÇAS, 2008). Dentes acompanhados por cinco anos, que mostraram testes microbiológicos negativos no momento da obturação, apresentaram taxas de sucesso mais elevadas (94%) em relação aos que mostraram testes positivos (68%) (SJOGREN *et al.* 1997). A forma de organização em biofilme nos canais radiculares foi inicialmente descrita por Nair (1997) como os “aglomerados microbianos”. Posteriormente, foi descrito como uma comunidade microbiana caracterizada por células ligadas a um substrato envoltas por uma matriz polissacarídica, exibindo formas alteradas de crescimento (DONLAN & COSTERTON, 2002). Essa modalidade permite a sobrevivência bacteriana em meios hostis, como o canal radicular após terapia endodôntica, e garante maior resistência aos fármacos normalmente utilizados. Os níveis de oxigênio para o interior do biofilme podem ficar bastante escassos, fazendo com que nichos estritamente anaeróbios se desenvolvam nas partes mais internas. Dessa forma, nem todas as bactérias no interior do biofilme são atingidas por um antimicrobiano da mesma maneira.

Quando o biofilme encontra-se presente, sua remoção e desorganização tornam-se essencialmente mecânicas. Entretanto, a complexidade da anatomia interna dos canais radiculares torna difícil sua eliminação completa pelas técnicas de instrumentação atuais (NAIR *et al.*, 2005).

Dentre os procedimentos envolvidos no controle da infecção do sistema de canais radiculares, a irrigação constitui uma importante etapa no processo de erradicação microbiana. A eficiência da limpeza e modelagem está na dependência direta da qualidade do preparo mecânico, das propriedades da solução irrigadora e da

medicação intracanal (BERUTTI & MARINI, 1996; FUKUZAKI, 2006; CLEG *et al.*, 2006).

A irrigação desempenha papel fundamental nas regiões inacessíveis aos instrumentos endodônticos, como túbulos dentinários, canais laterais, istmos, deltas, áreas de reabsorção, dentre outras. Frente à existência dessas zonas, onde a atuação mecânica torna-se limitada, fica evidente a necessidade do emprego de meios químicos que proporcionem uma atuação antimicrobiana efetiva e remoção do biofilme (NAIR *et al.*, 2005)

Dentre as principais propriedades desejadas de um irrigante inclui-se a dissolução de matéria orgânica e efeito antibacteriano, associados a uma baixa toxicidade (ROSSI-FEDELLE *et al.*, 2010).

1.1 Hipoclorito de Sódio

O hipoclorito de sódio (NaOCl) constitui o irrigante mais amplamente utilizado na Endodontia (QUALTROUGH, WHITWORTH & DUMMER, 1999). Com efeito antimicrobiano de amplo espectro, também possui ação de dissolução de matéria orgânica. O aumento de sua concentração implica em ganho dessas duas propriedades. Como o NaOCl não remove *smear layer* (BERUTTI & MARINI, 1996; BERTRAND *et al.*, 1999), uma combinação com EDTA 17% é normalmente empregada. Inúmeros estudos têm avaliado as suas propriedades antimicrobianas, variando sua concentração e tempo de contato.

Clegg *et al.* (2006) avaliaram o efeito do NaOCl nas concentrações de 1%, 3% e 6%, clorexidina 2% e *Biopure* MTDA no biofilme apical. Material coletado de 10 canais de dentes de pacientes portadores de PA crônica foi utilizado para a contaminação de

hemisseções de ápices dentários gerando um biofilme polimicrobiano. Cada fragmento com seu biofilme distinto foi separadamente imerso nas soluções em teste e foram, posteriormente, submetidos a análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os resultados mostraram que o NaOCl 3% e 6% foram capazes de desestruturar e remover o biofilme. O NaOCl 1% e a solução de MTDA foram capazes de romper a estrutura do biofilme, mas não de eliminar as bactérias. A clorexidina 2% não foi capaz de desestruturar o biofilme. O NaOCl 6% foi o único irrigante capaz de desestruturar e remover o biofilme e ainda inviabilizar as bactérias.

No mesmo ano, Berber *et al.* (2006) avaliaram a eficácia antimicrobiana do NaOCl, nas concentrações de 0,5%, 2,5% e 5,25% em combinação com diferentes técnicas de preparo, em canais radiculares e túbulos dentinários. A amostra foi composta por 180 dentes extraídos que foram divididos de acordo com os sistemas de instrumentação, manual ou automatizada, e com as diferentes soluções irrigadoras. Coletas microbiológicas foram realizadas antes e após os preparos. Os dentes foram clivados e chips de dentina dos três terços foram coletados e incubados por 48 horas. Contagem de unidades formadoras de colônia (UFCs) foi realizada nas amostras. Como resultado, o NaOCl 5,25% demonstrou ser o irrigante mais efetivo, independente do terço do canal radicular e da técnica de instrumentação utilizada.

Oliveira *et al.* (2007) compararam a atividade antimicrobiana das soluções irrigadoras clorexidina gel 2% e do NaOCl, nas concentrações de 1,5% e 5,25%. Oitenta dentes unirradiculares foram infectados e amostras intracanal foram coletadas antes, imediatamente após e sete dias depois dos preparos. As amostras foram cultivadas em placas de cultura e a contagem de UFCs foi realizada. Todos os irrigantes promoveram uma redução significativa de microrganismos logo após os preparos. O NaOCl 5,25% e a clorexidina 2% mantiveram esta condição nas amostras coletadas em 7 dias. Contudo,

nesse mesmo período, o NaOCl 1,5% apresentou crescimento bacteriano similar ao grupo controle.

Retamozo, Shabahang & Johnson (2010), pesquisaram o tempo e a concentração do NaOCl necessários para a desinfecção de incisivos bovinos infectados com *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*). As concentrações de 1,3%, 2,5% e 5,25% foram empregadas nos intervalos de tempos de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 minutos, totalizando trinta subgrupos. Após a contaminação, as amostras foram imersas nas soluções de acordo com os tempos estipulados. Na sequência, foram incubados por 72 horas em caldo de cultura e a turvação do meio foi avaliada. O regime mais efetivo foi o NaOCl 5,25%, por 40 minutos, enquanto as demais concentrações mostraram-se ineficazes na remoção do *E. faecalis* neste mesmo intervalo de tempo. Os autores concluíram que para a eliminação do *E. faecalis* dos túbulos dentinários é necessário uma concentração mais elevada de NaOCl, em um tempo maior de exposição.

Dois protocolos de irrigação, NaOCl 5,25% e EDTA 17% alternados e NaOCl 5,25% associado a irrigação final com EDTA 17%, empregados em dentes extraídos e contaminados com *E. faecalis* foram comparados por Soares *et al.* (2010). Um grupo controle de irrigação com água destilada foi utilizado. Coletas microbiológicas intracanal foram realizadas antes, logo após e diariamente até 14 dias depois dos preparos dos canais radiculares. Culturas negativas foram obtidas nas coletas realizadas logo após os preparos dos dentes dos grupos experimentais. No grupo onde foi realizada a irrigação alternada não foi detectada presença do *E. faecalis* durante os 14 dias de acompanhamento. No grupo onde foi apenas realizada uma irrigação final com EDTA foram observadas taxas de infecção similares ao grupo controle a partir do 12º dia.

Pela análise da literatura, constata-se que o NaOCl em altas concentrações

apresenta ação antimicrobiana mais eficaz que em concentrações mais baixas. Entretanto, estudos *in vivo* e *in vitro* têm comprovado a citotoxicidade do NaOCl, mesmo nas concentrações clinicamente recomendadas, quando ocorre extrusão da solução para os tecidos periapicais (SPANGBERG, ENGSTROM & LANGELAND, 1973; KOSKINEN, RAHKAMO & TUOMPO, 1981; GATOT *et al.* 1991; YESILSOY *et al.*, 1995; KOULAOUZIDOU *et al.*, 1999). Por razão deste efeito adverso potencialmente perigoso, recomenda-se que as agulhas de irrigação sejam posicionadas passivamente no interior dos canais radiculares (BROWN *et al.* 1995). Além disso, desvantagens como a diminuição da resistência dentária à fratura (WHITE *et al.*, 2002), redução dos módulos flexural e de elasticidade da dentina (SIM *et al.*, 2001; GRIGORATOS *et al.*, 2001) e alteração no componente orgânico dentinário (MOREIRA *et al.*, 2009) também têm sido associados ao emprego do NaOCl.

O NaOCl ainda é atualmente a solução irrigadora de primeira escolha. Contudo, a remoção efetiva do biofilme requer um volume de solução e um tempo de contato que acaba por prolongar em demasia o tempo de tratamento. Além disso, soma-se a necessidade do emprego de concentrações elevadas para se atingir uma desinfecção adequada. Esses fatores implicam diretamente no aumento da sua toxicidade e efeitos deletérios sobre a dentina. Frente a isso, novas substâncias irrigadoras e protocolos alternativos de desinfecção dos canais radiculares estão sendo investigados.

1.2 Sterilox

As águas super-oxidadas (SOWs) têm sido sugeridas como alternativa ao NaOCl pelo seu efeito antimicrobiano, capacidade de remoção de biofilme e baixa toxicidade demonstrados em estudos iniciais (SOLOVYEVA & DUMMER, 2000; MARTIN &

GALLAGHER, 2005).

O irrigante Sterilox (Sterilox Technologies Inc., Radnor, United States) é uma SOW constituída por uma solução de cloreto de sódio eletrolisada pela passagem em eletrodos de titânio, resultando em uma solução de ácido hipocloroso. Possui um potencial de oxidação maior do que 950 mV e um pH entre 5,0 e 6,5. Este irrigante vem sendo utilizado para desinfecção de mangueiras e reservatórios de água em unidades odontológicas e médicas, pois apresenta baixa toxicidade e não causa corrosão nos equipamentos. Quando o Sterilox foi avaliado para este fim, apresentou capacidade de remoção do biofilme (SHETTY *et al.*, 1999).

Shetty *et al.* (1999), avaliando a solução de Sterilox na desinfecção de endoscópios, encontraram alta eficácia na eliminação de esporos, micobactérias, fungos e uma variedade de outros microrganismos, quando utilizada dentro do período de 24 horas após seu preparo. Contudo, constataram também que a sua atividade antimicrobiana é reduzida sensivelmente na presença de matéria orgânica.

Um estudo piloto foi realizado por Solovyeva & Dummer (2000) para avaliar a capacidade de limpeza das SOWs contendo uma mistura de HOCl (ácido hipocloroso), Cl⁻ (cloro), ClO (monóxido de cloro) e H₂O₂ (peróxido de hidrogênio), em um pH de 7,7. A amostra foi composta por 20 dentes humanos unirradiculares extraídos, divididos em 4 grupos. Os canais radiculares foram instrumentados por técnica manual e os seguintes irrigantes foram utilizados em cada um dos grupos: água destilada, NaOCl 3%, anolito de cloro ativo e uma combinação do anolito e catolito de cloro ativo. Após, as raízes foram cortadas longitudinalmente e as metades dos canais foram avaliadas em MEV, quanto à presença de *debris* e *smear layer*. Todos os irrigantes demonstraram-se superiores quando comparados à água destilada. A capacidade de

limpeza foi similar entre o NaOCl 3% e o anolito, enquanto que a combinação do catolito e anolito mostrou-se bastante efetiva, principalmente na limpeza do terço apical. Nenhum dos irrigantes promoveu completa remoção da *smear layer*, contudo as SOWs apresentaram melhores resultados na limpeza da paredes dentinárias. Os autores apontaram que elas podem ser uma alternativa para o NaOCl na terapia endodôntica convencional.

Em agosto de 2006, seu uso como irrigante intracanal em Endodontia foi liberado pelo Food and Drug Administration, pois associado às suas propriedades antimicrobianas, apresenta baixa toxicidade. Este dado comprova-se pelo fato de que o ácido hipocloroso também é produto das células do sistema imunológico via cadeia de reações anaeróbias, para eliminar patógenos invasores e combater o processo infeccioso (FANG, YANG & WU, 2002).

Em um estudo *ex vivo*, Garcia *et al.* (2010) avaliaram a solução de Sterilox (Aquatine) na remoção de biofilme. A amostra foi composta por 45 dentes humanos unirradiculares extraídos, divididos em 5 grupos de irrigantes: água destilada (controle), Aquatine, Aquatine e EDTA 17% (irrigação final por 15 segundos), NaOCl 6% e NaOCl 6% e EDTA 17% (irrigação final 15 segundos). A solução de Sterilox foi empregada na concentração de 180 - 250 ppm em um pH de 5,35 - 6,75. Os dentes foram contaminados com *E. faecalis* por 28 dias. Após, os canais radiculares foram instrumentados com o sistema *Profile* e irrigados com as soluções propostas, no volume de 5 ml a cada troca de instrumento. Os dentes foram cortados longitudinalmente e as paredes dos canais radiculares avaliadas em MEV. Os protocolos de irrigação que empregaram a solução de Sterilox e NaOCl 6% demonstraram efetividade similar na remoção do biofilme de *E. faecalis*.

A ação antimicrobiana do Sterilox contra o *E. faecalis* também foi avaliada por Rossi-Fedele *et al.*, em 2010. Neste estudo, incisivos bovinos foram preparados, inoculados e incubados com *E. faecalis* por 10 dias. Após, foram irrigados com uma das seguintes soluções: NaOCl 5%, Sterilox (Aquatine) e Optident Sterilox (essencialmente solução salina, usada como controle negativo). Na sequência, amostras de dentina foram coletadas, colocadas em cultura e o crescimento bacteriano foi quantificado por contagem de UFCs. O NaOCl foi a única solução irrigadora a eliminar consistentemente o *E. faecalis*. A solução de Sterilox mostrou-se superior ao controle negativo, mas menos efetiva do que o NaOCl.

Também em 2010, Hope *et al.* avaliaram o efeito das SOWs e do NaOCl 1% em dentes humanos extraídos contaminados com biofilme de *E. faecalis*. A irrigação foi realizada com uma pipeta eletrônica que liberava as soluções numa velocidade controlada e reproduzível. Experimentos em paralelo, empregaram uma membrana de biofilme que era imersa diretamente na solução irrigante proposta. Após 60 segundos de exposição, o NaOCl 1% eliminou completamente o biofilme da membrana, entretanto 3.36 log de *E. faecalis* viáveis foram recuperados do canal do dente extraído. As SOWs mostraram-se ineficazes, sendo o NaOCl o biocida mais eficaz em ambos experimentos. Os autores sugeriram que a permanência de microrganismos viáveis nos canais radiculares após a irrigação seria devido à incapacidade do irrigante penetrar por todas as regiões contaminadas.

Alguns estudos (SHETTY *et al.*, 1999; ROSSI-FEDELE *et al.*, 2011; ROSSI-FEDELE *et al.*, 2013) sugerem que as SOWs não apresentam capacidade de dissolução de matéria orgânica clinicamente relevante. Talvez esse possa ser um dos fatores responsáveis pela baixa capacidade antimicrobiana apresentada por essas soluções em alguns estudos, principalmente naqueles que avaliam a capacidade de remoção de

biofilmes.

As pesquisas sobre o emprego das SOWs como irrigantes de canais radiculares até hoje não demonstraram resultados muito animadores sobre a sua eficácia antimicrobiana. Contudo, não foram encontrados na literatura estudos que mencionassem o uso dessa substância em concentrações mais elevadas. Da mesma forma, também não constam pesquisas *in vivo*, onde a resposta tecidual ao tratamento foi verificada.

1.3 Terapia Fotodinâmica

A desinfecção por meios fotoativados, em várias áreas da Odontologia, tem sido exaustivamente estudada nos últimos anos, apresentando resultados promissores. O seu emprego na Endodontia objetiva maximizar os efeitos antimicrobianos da terapia, diminuindo o tempo de tratamento e elevando suas taxas de sucesso.

Vários sistemas de *laser* têm sido investigados como adjuntos dos métodos de desinfecção dos canais radiculares. O seu emprego estaria baseado no princípio de que sua luz seria capaz de alcançar áreas inacessíveis à terapia convencional. Odor *et al.* (1996) demonstraram que os túbulos dentinários funcionam como canais de fibra ótica, redirecionando a luz em múltiplas direções. *Lasers* como os de CO₂ (dióxido de carbono, 10.600 nm), Nd:YAG (*neodymium-doped yttrium aluminium garnet*, 1064 nm), Er:YAG (*erbium-doped yttrium aluminium garnet*, 2940 nm) e diodo (810 ou 980 nm) foram avaliados na desinfecção em Endodontia, apresentando taxas de sucesso variadas. Os melhores resultados foram obtidos com o sistema de Nd:YAG. Um estudo de Moritz *et al.* (1999) verificou uma redução microbiana de 99,16% em canais radiculares inoculados, após a irradiação com esse sistema. Resultados semelhantes

foram encontrados nos estudos de Folwaczny *et al.* (2002) e de Piccolomini *et al.* (2002).

A hipótese sobre o efeito bactericida dos *lasers* de alta potência é de que ocorre um aquecimento dose-dependente, agindo sobre os microrganismos pelos seguintes mecanismos: aquecimento do meio acima de níveis tolerados, assim como do interior da célula bacteriana ou de sua modulação enzimática (HELLINGWERF, HOFF & CRIELAARD, 1996).

Entretanto, este aquecimento pode ocasionar efeitos indesejáveis como a carbonização e erosão dos tecidos dentinários (DEPRAET, DE BRUYNE & DE MOOR, 2005) e possíveis injúrias térmicas aos tecidos periodontais, resultando em reabsorções, anquilose ou mesmo necrose desses tecidos (BAHCALL *et al.*, 1992).

Buscando superar essas desvantagens, os *lasers* de baixa potência e outros sistemas fotoativados começaram a ser investigados. A tecnologia da terapia fotodinâmica (PAD) é baseada em uma solução dispersante, geralmente o cloreto de tolônio, ativada por uma luz (*laser* diodo) de comprimento de onda específico (635 nm). A solução de cloreto de tolônio age corando as células bacterianas nos tecidos moles e duros. Quando fotoativada, libera oxigênio molecular, causando a ruptura da parede celular bacteriana. Tanto a solução corante, quanto o oxigênio liberados durante o processo de morte da célula bacteriana não apresentam toxicidade para o paciente (BERGMANS *et al.*, 2008).

Dessa forma, esse método de desinfecção age de forma seletiva, não afetando os demais tecidos. Segundo dados do fabricante, a PAD mostra-se efetiva contra os microrganismos comuns das infecções endodônticas, incluindo o *E. faecalis* e a *C. albicans*. Dobson & Wilson (1992) demonstraram que a PAD mostrou-se efetiva contra a

microbiota habitual da cavidade oral, mesmo quando organizada em biofilmes.

Na versão mais atual da PAD™ Plus, a fonte emissora de luz do *laser* diodo e a fibra óptica da versão anterior (PAD *SaveDent*) foram substituídas por uma ponteira de LED de 7 mm. Houve, portanto, um aumento no tamanho do condutor de luz, propiciando um aumento da superfície atingida em uma exposição, sem aumento significativo de calor gerado (MEIRE *et al.*, 2009).

Em 2006, Bonsor *et al.* (2006) avaliaram *in vivo* a capacidade antimicrobiana das combinações de ácido cítrico 20% + PAD (G1) e ácido cítrico 20% + NaOCl 2,25% (G2), nas paredes dentinárias de 46 canais radiculares preparados. Após o acesso aos canais radiculares, foram realizadas coletas microbiológicas de suas paredes, por meio de instrumentos endodônticos. A seguir, no G1, foi realizado um alargamento inicial do conduto (até a lima #25), utilizando ácido cítrico como irrigante, e a PAD foi realizada. A solução corante empregada foi o cloreto de tolônio. Os parâmetros de irradiação foram de 100 mW por 120 segundos, gerando 12 J. A fibra óptica foi introduzida até 4 mm aquém do comprimento de trabalho e movimentos de tração e introdução de aproximadamente 3 mm de amplitude foram realizados, em períodos de 20 segundos. No G2, foi empregado o preparo convencional do conduto utilizando como irrigantes o NaOCl e o ácido cítrico, de forma alternada. Foi realizada, então, a segunda coleta microbiológica nos dois grupos. No G1, o preparo dos canais radiculares foi concluído utilizando os irrigantes NaOCl e ácido cítrico com alargamento apical até o instrumento #35 conicidade .04. O G2 recebeu a PAD. Concluídos os procedimentos, uma terceira amostra foi coletada. A análise das amostras da segunda coleta encontrou bactérias viáveis em apenas 2 casos do G1. Em um destes dois dentes, nas amostras da terceira coleta, não foram observadas bactérias viáveis. No G2, quatro dentes apresentaram cultura positiva na segunda coleta (24%). Após PAD, na terceira coleta, 3 dos 4 canais

radiculares passaram a apresentar cultura negativa. Dessa forma, este estudo propôs um protocolo de desinfecção alternativo, com índices de sucesso superiores, menor toxicidade e menor tempo despendido.

A desinfecção de canais de dentes humanos extraídos (n=38) contaminados por *S. anginosus*, *E. faecalis* ou *F. nucleatum* foi avaliada por Bergmans *et al.* (2008). Os métodos empregados para desinfecção foram: PAD (cloreto de tolônio como corante), *laser* + RTF (fluido de transporte reduzido) e cloreto de tolônio isoladamente. Os parâmetros utilizados para o *laser* (diodo) foram 635 nm, 100 mW e 15 J e, para o corante, concentração de 12,7 mg/ml e pH 5. Após o preenchimento dos canais radiculares com o corante, a luz foi aplicada por 150 segundos, conforme as instruções do fabricante. As coletas microbiológicas foram realizadas com pontas de papel absorventes esterilizadas. O resultado da contagem das UFCs foi associado com observações em MEV das alterações estruturais nas células bacterianas, antes e após a PAD. A PAD promoveu uma redução bacteriana significativa (*S. anginosus* 93,8%, *E. faecalis* 88,4% e *F. nucleatum* 98,5%), mas não eliminou o componente bacteriano dos condutos. A luz e o corante utilizados de forma isolada não apresentaram efeito bactericida. Os autores concluíram que a PAD não constitui uma alternativa, mas um possível suplemento aos protocolos existentes para desinfecção dos canais radiculares. Ela promove uma interação entre a luz e o corante, promovendo um efeito bactericida de amplo espectro. Contudo, apontaram que os patógenos que se desenvolvem em biofilmes de uma única espécie são mais difíceis de serem erradicados.

Um estudo de Meire *et al.* (2009) comparou *ex vivo* a eficácia antimicrobiana da irradiação com *laser* (Nd:YAG e KTP (*Potassium Titanyl Phosphate*)), da PAD e do NaOCl 2,5%, contra o *E. faecalis*. Sessenta dentes monorradiculares extraídos foram preparados até o instrumento #50. Os parâmetros utilizados foram: Nd:YAG – irradiação

de 1064 nm, 1,5 W, 10 Hz. A fibra óptica foi trazida de apical para cervical, com movimentos em espiral, por 5 vezes de 5 segundos, com intervalos de 20 segundos, gerando 37,5 J; KTP – irradiação de 532 nm, 1 W, 10 Hz, na mesma cinemática, pelos mesmos intervalos de tempo; PAD – preenchimento dos canais radiculares com cloreto de tolônio na concentração 12,7 mg/mL e pH 5, irradiação de 635 nm, 100 mW, em movimentos de entrada e saída do canal radicular no tempo total de 150 segundos, gerando 15 J; NaOCl 2,5% – preenchimento dos canais radiculares por 3 períodos de 5 minutos, com tempo total de contato de 15 minutos. O quinto grupo (controle positivo) não recebeu tratamento. A avaliação das bactérias sobreviventes nos canais radiculares foi realizada por citometria de fase sólida e contagem de UFCs. A PAD e o NaOCl 2,5% promoveram uma redução bacteriana significativa, enquanto que a irradiação com *laser* de alta potência, Nd:YAG e KTP, não se mostrou efetiva. Embora os resultados da PAD tenham apresentado significância estatística em relação ao controle, mostraram-se clinicamente irrelevantes. O NaOCl 2,5% foi a técnica mais efetiva na redução microbiana.

O efeito antimicrobiano da PAD sobre as suspensões de *E. coli*, *C. albicans*, *E. faecalis*, *F. nucleatum* e *S. intermedius* foi avaliada por Schlafer *et al.* (2010). Também avaliaram seu efeito em canais de molares extraídos preparados e inoculados com *S. intermedius*. A PAD foi realizada logo após a inoculação e incubação. O corante usado foi o cloreto de tolônio e o tempo de irradiação foi de 30 segundos. Os resultados apontaram uma redução significativa na contagem de microrganismos nas suspensões e nos canais radiculares infectados.

Já um estudo de Souza *et al.* (2010) não encontrou ação antimicrobiana suplementar quando a PAD foi realizada após o PQM de canais de dentes extraídos. Testaram o emprego de dois corantes, azul de metileno e cloreto de tolônio, e dois

irrigantes, NaOCl 2,5% e soro fisiológico (NaCl). Setenta canais foram contaminados com cepas de *E. faecalis* por 7 dias. Foram então divididos nos grupos experimentais onde os diferentes irrigantes foram combinados com os diferentes corantes para a PAD. Os corantes foram mantidos nos canais por 2 minutos antes da irradiação, por 4 minutos. Amostras foram coletadas antes e após a instrumentação/irrigação e após a PAD. As UFCs foram contabilizadas. Os resultados mostraram que, independente do irrigante utilizado, o preparo dos canais reduziu de forma significativa a carga microbiana. O NaOCl foi significativamente mais eficaz do que o NaCl, sendo que esta diferença permaneceu após a realização da PAD. A PAD não promoveu efeito antimicrobiano adicional significativo após a irrigação com NaCl. Não foram observadas diferenças significantes entre os corantes empregados. Baseados nos resultados do seu estudo, os autores concluíram que a PAD não exerceu um efeito antimicrobiano adicional na desinfecção intracanal. Por fim, os autores sugeriram ajustes ao protocolo da PAD buscando melhorar seu desempenho e previsibilidade da terapia.

Da mesma forma, Rios *et al.* (2011) avaliaram os efeitos da PAD após desinfecção convencional com NaOCl 6% de canais de dentes extraídos. Os canais foram limpos, esterilizados, modelados e incubados com *E. faecalis* por 2 semanas. Cinco protocolos de desinfecção foram realizados: NaOCl 6% (agulha 27-G, irrigação por 60 segundos), cloreto de tolônio (deixado no canal por 30 segundos), somente aplicação da luz (preenchimento do canal com NaCl), PAD (irradiação por 30 segundos) e NaOCl 6% (irrigação por 30 segundos) + PAD (30 segundos). A taxa de sobrevivência bacteriana foi determinada por meio da contagem de UFCs. No grupo onde a PAD foi realizada após desinfecção com NaOCl, a carga microbiana foi significativamente menor do que nos outros grupos. A PAD mostrou potencial bactericida quando utilizada como adjunto na terapia endodôntica.

Resultados semelhantes foram encontrados na pesquisa de Ng *et al.* (2011), onde a PAD foi avaliada em combinação com o PQM. Dentes com necrose pulpar e PA recém extraídos foram divididos em 2 grupos, onde um deles teve os canais preparados e irrigados com NaOCl 6% antes da PAD. O corante azul de metileno foi deixado por 5 minutos no interior dos canais previamente a irradiação. Amostras dos canais foram coletadas antes e após as terapias, sendo realizada a contagem de UFCs e uma caracterização parcial das espécies, por meio de sondas de DNA. O PQM combinado com a PAD apresentou uma significativa redução microbiana em canais com culturas positivas (86,5%), quando comparado ao seu efeito isolado (49%). A detecção dos níveis pós-operatórios para todos os tipos de bactérias foi marcadamente reduzida quando os dois métodos foram combinados. Neste estudo, a PAD mostrou-se como uma promissora adjunta ao PQM, promovendo uma redução significativa na carga microbiana residual.

Recentemente, Silva *et al.* (2012) investigaram o efeito antimicrobiano da PAD *in vivo*. Sessenta canais de dentes de cães com PAs induzidas foram tratados endodonticamente em sessão única e, após, divididos em 4 grupos: o grupo 1 recebeu a PAD, obturação do conduto (OC) e restauração coronária (RC); o grupo 2 recebeu a PAD e RC; no grupo 3 os canais receberam OC e RC, não sendo aplicada a PAD; o grupo 4 recebeu apenas a RC. O preparo dos canais foi realizado com o sistema ProTaper e a irrigação com NaOCl 2,5%. A resposta celular apical foi avaliada histologicamente após 90 dias. Os melhores resultados foram encontrados nos grupos onde a PAD foi empregada (grupos 1 e 2), onde a região apical dos canais apresentou moderada neoangiogênese e fibrogênese com ausência de células inflamatórias.

Bago *et al.* (2013) avaliaram o efeito antimicrobiano da irradiação do *laser* diodo, PAD e irrigação com NaOCl 2,5% com ativação sônica. Cento e vinte raízes de dentes

monorradiculares humanos extraídos foram preparadas, esterilizadas, contaminadas com suspensão de *E. faecalis* e incubadas por 7 dias. Após, foram divididas em 6 grupos: G1, irrigação com NaCl (agulha 30-G, 60 segundos) + laser diodo (2 W, 3 vezes de 20 segundos); G2, irrigação com NaOCl (agulha 30-G, 30 segundos) + ativação sônica (EndoActivator, 30 segundos); G3, irradiação com laser diodo pulsado (975 nm, 2 W, 3x 20 segundos); G4, PAD (660 nm, 100 mW, 60 segundos); G5, PAD com Endoprobe 3D (100 mW, 60 segundos); G6, irrigação com solução salina (30-G, 60 segundos). O corante utilizado no G4 foi o cloreto de tolônio e no G5 foi o cloreto de fenotiazina. O padrão de colonização foi avaliado em MEV. Amostras dos canais foram coletadas antes e após os tratamentos. O número de bactérias dos canais foi determinado por contagem de UFCs e a presença/ausência do *E. faecalis* foi também verificada por meio de PCR. Os resultados demonstraram uma redução microbiana significativa após todas as terapias. A PAD, em ambos sistemas de irradiação (G4 e G5), e a irrigação com NaOCl com ativação sônica (G2) foram significativamente mais eficazes que os outros protocolos.

Stojicic *et al.* (2013), diante das contradições ainda existentes quanto a eficácia antimicrobiana da PAD, propuseram modificações no agente corante, buscando potencializar sua ação. Adicionaram baixas concentrações de EDTA e de peróxido de hidrogênio ou clorexidina junto ao cloreto de tolônio em concentrações que também foram otimizadas. Compararam, então, a eficácia da PAD convencional e da modificada em suspensões e biofilmes de *E. faecalis* e de placa mista. Suspensões de 4 cepas de *E. faecalis* e placa mista de voluntários adultos foram colocadas nas seguintes soluções: 1) cloreto de tolônio; 2) cloreto de tolônio misturado com peróxido de hidrogênio 0,5% e gluconato de clorexidina 0,05%; 3) cloreto de tolônio misturado com peróxido de hidrogênio 0,5% e EDTA 0,05%; 4) cloreto de tolônio misturado com EDTA 0,05% e

gluconato de clorexidina 0,05%. As suspensões de *E. faecalis* foram expostas a irradiação por tempos de 30 segundos, 1 ou 3 minutos. Imediatamente após as irradiações, amostras foram colhidas, cultivadas e, em 24 e 48 horas, as UFCs foram contabilizadas. Já as suspensões de placa foram irradiadas por tempos de 1, 3 ou 5 minutos. O crescimento microbiano foi verificado em 72 horas, sendo acompanhado por até 5 dias para verificar algum crescimento tardio. Os biofilmes foram desenvolvidos em discos de hidroxiapatita esterilizados e incubados por 3 semanas. Os discos foram então expostos ao corante e combinações e irradiados por 1 minuto. As avaliações foram realizadas por meio de microscopia confocal. A PAD modificada mostrou-se superior a PAD convencional contra os microrganismos da placa e *E. faecalis* em suspensão ou organizados em biofilmes. Também, apresentou melhor ação bactericida em um tempo bem menor de irradiação, sendo de 2 a 8 vezes mais efetiva na eliminação do biofilme, quando comparada com a clorexidina 2% e o NaOCl 1% e 2%.

Ao mesmo tempo em que estudos demonstram resultados promissores, outras pesquisas tem demonstrado que a PAD, quando empregada isoladamente, apresenta efeito antimicrobiano inferior aos irrigantes normalmente utilizados (SOUKOS, CHEN & MORRIS, 2006; BERGMANS *et al.*, 2008). Entretanto, tem-se mostrado resultados animadores quando empregada juntamente com o PQM (RIOS *et al.*, 2011; NG *et al.*, 2011, SILVA *et al.*, 2012), revelando-se como um promissor adjunto na terapia endodôntica. Sua grande vantagem, a segurança, faz com que este método de desinfecção continue sendo exaustivamente investigado.

1.4 Emprego da Radiografia Periapical e da Tomografia Computadorizada por Feixe Cônico para o diagnóstico das periodontites apicais

O diagnóstico das PAs, o acompanhamento clínico e a determinação das taxas de sucesso após a terapia endodôntica normalmente são acessados por meio de radiografias periapicais (PRs) (BENDER & SELTZER, 1961; ORSTAVIK, KEREKES & ERIKSEN, 1986; TROPE *et al.*, 1999; ORDINOLA-ZAPATTA *et al.*, 2011). As alterações no grau de mineralização e na estrutura do osso periapical observadas nas PRs ainda são os maiores indicativos da presença, aumento ou da remissão das PAs após o tratamento endodôntico (HUUMONEN & ORSTAVIK, 2002).

Nas revisões sistemáticas de literatura que versam sobre os resultados e prognóstico do tratamento endodôntico, as quais representam evidência científica de alta qualidade, a PR foi utilizada em todos estudos clínicos como método de avaliação (TROPE, DELANO & ORSTAVIK, 1999; WU, DUMMER & WESSELINK, 2006; ORDINOLA-ZAPATTA *et al.*, 2011).

Apesar do seu difundido uso, estudos têm demonstrado que a PA pode estar presente e não ser visível na PR (PATEL *et al.*, 2009). Imagens bidimensionais comprimem estruturas tridimensionais, diminuindo altamente a sua performance de diagnóstico (HUUMONEN & ORSTAVIK, 2002). Características importantes dos dentes e dos seus tecidos circundantes no plano mesio-distal podem não ser completamente apreciadas numa PR. Da mesma forma, a relação espacial do dente com estruturas associadas pode não ser completamente visualizada (COTI *et al.*, 1999). Além disso, a superposição e a distorção geométrica de estruturas, o contraste radiográfico, a

subjetividade dos avaliadores, dentre outros fatores, influenciam na interpretação radiográfica (MURMULLA *et al.*, 2005; DE ROSSI *et al.*, 2007; ESTRELA *et al.*, 2008; PAULA-SILVA *et al.*, 2009).

Em um estudo clássico de Bender & Seltzer (1961), lesões ósseas artificiais foram produzidas em cadáveres. As lesões somente puderam ser detectadas pelas PRs se perfurações, destruição extensiva do osso cortical da superfície externa ou erosão da parede interna da cortical óssea estivessem presentes. A PA, quando confinada dentro do osso cortical, não pode não ser evidenciada pela PR. Somente quando há envolvimento das corticais ocorre a formação de áreas distintas de rarefação. A espessura da cortical que recobre a PA exerce grande influência na sua detecção (BENDER, 1982; VAN DER STELT, 1985; STABHOLZ, FRIEDMAN & TAMSE, 1994; HUUMONEM & ORSTAVIK, 2002; RICUCCI & BERGENHOLTZ, 2003). Para serem visíveis radiograficamente, as lesões ósseas devem ter entre 30% - 50% de perda mineral (ESTRELA *et al.*, 2008).

A tomografia computadorizada por feixe cônico (TCFC) tem sido amplamente usada na medicina desde os anos 70 (BRENNER & HALL, 2007), aparecendo na pesquisa endodôntica em torno dos anos 80 (TROPE *et al.*, 1989). A TCFC apresenta a grande vantagem da possibilidade de avaliações tridimensionais. Dessa forma, permite a visualização do dente e sua relação fiel com as outras estruturas, características fundamentais para a seleção e planejamento da terapia a ser realizada. A TCFC possibilita, também, a realização de mensurações volumétricas, por meio de softwares específicos. Na Endodontia, permite uma detecção prematura e um diagnóstico mais acurado da PA quando comparada à PR (LOFTHAG-HANSEN *et al.*, 2007; PATEL *et al.*, 2007; LOW *et al.*, 2008; KENNETH *et al.*, 2008; ESTRELA *et al.*, 2008; COTI, 2010). De acordo com a literatura, detecta aproximadamente 62% mais PAs em dentes

posteriores (FUHRMANN, BUCKER & DIEDRICH, 1997; FRIEDMAN, 2002).

Um estudo de Velvart, Hecker & Tillinger (2001) correlacionou dados de PRs e TCFCs aos achados de cirurgias parendodônticas, sobre a presença de PAs em 50 pacientes. Todas as 78 lesões removidas cirurgicamente foram previamente visualizadas nas TCFCs. Contrastando, apenas 61 (78,2%) das PAs foram detectadas nas PRs.

Da mesma forma, Estrela *et al.* (2008) realizaram um estudo avaliando a acurácia de exames de imagens na detecção da PA. Registros de 888 exames de imagens de pacientes com infecção endodôntica (1508 dentes), incluindo TCFC, PRs e radiografias panorâmicas foram selecionados. A sensibilidade, especificidade e acurácia da PR e da radiografia panorâmica foram calculadas. A prevalência da PA na CBCT foi significativamente maior. A sensibilidade global foi de 0,55 e 0,28 para PR e radiografia panorâmica, respectivamente. A especificidade mostrou-se elevada em todos os grupos dentários para ambos exames, variando de 0,96 a 1. A acurácia média foi de 0,70 e 0,54 para a PR e radiografia panorâmica, respectivamente. A PR apresentou acurácia significativamente maior que a radiografia panorâmica, porém, bastante inferior a TCFC. O estudo sugere que o diagnóstico das PAs pelas PRs e radiografias panorâmicas é frequentemente subestimado.

A acurácia de exames de imagem na detecção das PAs, usando os achados histológicos como padrão ouro, foi investigado por Paula-Silva *et al.* (2009). O periápice de 83 canais radiculares de dentes de cães, endodonticamente tratados ou não, foi examinado por meio de PR, TCFC e histologia. A sensibilidade, especificidade, valores preditivos e acurácia da CBCT e da PR foram calculados. A PR detectou a PA em 71% dos casos, enquanto que a TCFC em 84% e a histologia em 93%. No geral, a

sensibilidade foi de 0.77 e 0.91 para PR e TCFC, respectivamente. A especificidade foi 1 para ambos. Os valores preditivos negativos foram 0,25 para PR e 0,46 para CBCT. Os valores preditivos positivos foram 1 para ambos. A acurácia da PR foi de 0,78 e da TCFC de 0,92. A TCFC se mostrou mais sensível na detecção das PAs, quando comparada a PR. Quando usado o exame radiográfico na detecção das PAs, a probabilidade de ela não ser visualizada quando presente é maior.

A detecção precoce da patologia permite que seu tratamento seja iniciado mais cedo. Isto, provavelmente, resultará num melhor prognóstico (NAKATA *et al.*, 2006; PATEL *et al.*, 2007). Outra vantagem da TCFC é sua capacidade de mostrar a extensão total da PA e sua relação com as outras estruturas, permitindo ao clínico selecionar o tratamento mais adequado e realizar um acompanhamento da evolução pós-terapia mais confiável.

Um estudo de Ordinola-Zapata *et al.* (2011) investigou a extensão da destruição óssea periapical em dentes de cães por meio da TCFC e da PR. Somente as raízes distais foram tratadas e as mesiais foram usadas como controle. Cepas de *E. faecalis* foram inoculadas em 30 canais de 2 cães para a indução de PAs. Após 60 dias, 11 canais de dentes mandibulares e 4 canais de dentes maxilares foram endodonticamente tratados (n=15). A destruição óssea foi avaliada, após 6 meses, em PRs e TCFCs. A área das PAs foi mensurada em mm² nas PRs e nos cortes sagitais e coronais da TCFC, por meio do software ImageTool. O volume das PAs foi medido nas TCFC em mm³ por meio do software Osiri-X. Não foi encontrada uma distribuição normal dos dados. O coeficiente de correlação de Person foi calculado entre a PR e os dados volumétricos da TCFC, não sendo encontrada correlação entre eles, nos canais tratados (r=0.48), demonstrando que a destruição óssea pode estar presente e não ser detectada radiograficamente. Nos controles foi encontrada uma correlação positiva entre os

métodos ($r=0.73$). Embora os cortes sagitais da TCFC mostraram valores similares de destruição óssea entre os canais tratados e os controles, os dados volumétricos mostraram uma diminuição em torno de 50% das PAs nos canais tratados. Este estudo confirmou que áreas maiores de destruição óssea podem ser visualizadas na TCFC e mostrou a dificuldade para delimitar a extensão das PAs nas PRs. Demonstrou também que os cortes tomográficos sagitais fornecem uma determinação mais acurada do maior diâmetro da extensão da PA. Porém deve-se tomar cuidado com essa informação, pois levando-se em conta somente essa medida, pode-se superestimar o tamanho da PA, visto que ela não leva em consideração os dados tridimensionais.

Nas mensurações clínicas, quando um novo método de medida é introduzido, comparações com o método padrão são necessárias para verificar se eles concordam suficientemente entre si para que o novo possa substituir o antigo (BLAND & ALTMAN, 1986). Muitos estudos trazem o coeficiente de correlação entre os resultados de dois métodos de mensuração como um indicador de concordância. Entretanto, mesmo uma alta correlação não indica que eles concordam (BLAND & ALTMAN, 1986). Os gráficos de Bland & Altman são extensivamente utilizados para avaliar a concordância entre as mensurações de duas técnicas, onde cada uma delas traz alguns erros em suas medidas (HANNEMAN, 2008). Esses gráficos nos permitem investigar a existência de diferenças sistemáticas entre as medidas de dois métodos e identificar possíveis valores discrepantes (ALTMAN & BLAND, 1999).

Os dados obtidos nos exames de imagem representam um método indireto para o diagnóstico das PAs, visto que o acesso aos dados histológicos, que constituem o método direto de obtenção das informações reais, não é possível na maioria das vezes. A comparação entre os dados fornecidos pelos exames de imagem e os correspondentes histológicos permite a avaliação da sua especificidade e sensibilidade.

Entretanto, a histologia não pode ser considerada um método apropriado para a mensuração das dimensões da PA, especialmente seu volume, a menos que cortes seriados sejam realizados, na totalidade da lesão.

De acordo com as informações apresentadas nesta revisão da literatura, a TCFC, atualmente, representa o método mais acurado para as mensurações das PAs. Contudo, da mesma forma que PR, a TCFC apresenta erros em suas medidas. Por este motivo e por apresentarem grandezas diferentes, quando estes métodos forem comparados, a concordância entre eles deve ser avaliada.

Devido ao elevado poder de diagnóstico da TCFC frente à PR, e, sendo a PR o exame mais frequentemente empregado na clínica e na pesquisa, torna-se importante avaliar o quanto que a PR é capaz de nos mostrar, em relação ao tamanho real da PA. Assim, justifica-se a tentativa de estabelecer correlações e concordâncias deste exame com a TCFC, buscando-se aumentar o poder preditivo da PR.

2. Objetivos

O presente estudo realizou uma avaliação histológica da endodontia em sessão única de dentes de cães com periodontite apical utilizando as soluções irrigadoras Sterilox 400ppm, NaOCl 2% e NaOCl 5%, associados ou não a terapia fotodinâmica,. Avaliou, também, a correlação e a concordância entre os exames de imagem usados no diagnóstico da periodontite apical induzida em dentes de cães, radiografia periapical e tomografia computadorizada por feixe cônico, correlacionando com seu correspondente histológico.

3. Capítulo I

Artigo 1

An histological evaluation of different irrigating solutions and photo-activated therapy in a single visit root canal treatment of dog's teeth with apical periodontitis

Formatado conforme diretrizes do periódico *Journal of Endodontics*, Qualis A1 e Fator de impacto 2.929

An histological evaluation of different irrigating solutions and photo-activated therapy in a single visit root canal treatment of dog's teeth with apical periodontitis

Fernanda Ullmann López, MSc,¹ Patrícia Maria Poli Kopper, PhD,² Carolina Cucco, MSc,¹ Alvaro Della Bona, PhD,³ Liviu Steier, PhD,⁴ José Antônio Poli de Figueiredo, PhD,¹ Fabiana Vieira Vier-Pelisser, PhD.¹

1. Post-Graduate Program of Dentistry, School in Dentistry, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

2. Post-Graduate Program in Dentistry, School of Dentistry, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

3. Post-Graduate Program in Dentistry, School of Dentistry, University of Passo Fundo, Passo Fundo, RS, Brazil.

4. Post-Graduate Program of Dentistry, Warwick Medical School, University of Warwick, Coventry, United Kindom

Corresponding author:

Name: Fernanda Ullmann López

Post-Graduate Program in Dentistry, School of Dentistry, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul

Address: 6681 Ipiranga Av. Postal Code: 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil

Tel./Fax: +55 51 3026 7311 / +55 51 8409 0044

E-mail: fernanda.ullmann.lopez@gmail.com

Abstract

Introduction: This study carried out an histological evaluation of the root canal treatment of dog's teeth with apical periodontitis (APs) using 400 ppm Sterilox, 2% and 5% sodium hypochlorite (NaOCl), with and without photo-activated therapy (PAD).

Methods: Ten dogs were randomly divided into two groups (n = 5): with and without PAD, and the root canals into four subgroups, according to irrigation solution used: SX (400 ppm Sterilox), SH2 (2% NaOCl), SH5 (5% NaOCl) and SS (saline solution) as positive control. A total of 134 root canals were opened and left exposed to the oral environment for 14 days and then sealed for 60 days for AP induction. Then, root canals were treated in accordance with each disinfecting protocol proposed and filled in the same session. After 120 days, the dogs were euthanized and the periapical inflammatory events were evaluated under light microscopy. Qualitative data was submitted to Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests ($\alpha = .05$). **Results:** The PAD did not produce significant differences in the scores for apical inflammation when used after chemo-mechanical preparation. The irrigating solutions SX, SH2 and SH5 without PAD were statistically different from SS ($P < .05$) that presented the greatest scores for apical inflammation. SX group could be statistically compared to SH5 and SH2 groups as SX/PAD could be compared to SH5/PAD and SH2/PAD. **Conclusions:** PAD did not show any clinical relevance for the treatment of root canal with pulpal necrosis and APs. 400 ppm Sterilox may be considered an alternative to NaOCl in root canal treatment.

Key-words: photo-activated therapy, periapical periodontitis, light microscopy, super-oxidized waters

Introduction

The persistence of infection within the apical third of treated root canals is the main factor responsible for endodontic failures (1-2). The complexity of the internal anatomy of root canals prevents complete mechanical removal of the microorganisms by current instrumentation techniques (2). In this context, irrigation plays an important role in disinfecting the regions that cannot be assessed by endodontic instruments. Sodium hypochlorite (NaOCl) is the most frequently used irrigating solution due to its capability of dissolving organic tissues (3-4) and the broad antimicrobial spectrum (5). However, because its cytotoxicity (6), dentin strength weakening (7) and corrosion of NiTi-files causing early fractures (8), alternative disinfection protocols, including chemicals and photo-activated disinfection (PAD) therapy, have been assessed.

Super-oxidized waters (SOWs) were first used in dental and medical units disinfection due to its antimicrobial effect, capability to remove biofilm and low toxicity (9-10). Sterilox's Aquatine Alpha Electrolyte is a hypochlorous acid solution (pH between 5,0 - 6,5) and it has a redox potential greater than 950 mv. It has been suggested as an irrigating solution alternative to NaOCl as it showed efficient cleaning of root canal walls (11-12). 200 ppm Sterilox was tested *in vitro* against *Enterococcus faecalis* causing bacterial load decrease, but was less effective than NaOCl (13). However, there were no studies to date evaluating its efficacy *in vivo* as a root canal irrigant. Besides, the antimicrobial effect and biocompatibility of concentrations greater than 200 ppm also have not been investigated. This is a very important issue since the antimicrobial activity of SOW is dependent on highly reactive non-specific oxidants that are almost extinguished by the high levels of organic load present within the biofilm structure, so a sufficient concentration and exposure time would be required (14-15).

In addition, another disinfecting system, the PAD, has showed promising results when tested *in vitro* (16-18) and *in vivo* (19). Its use as an adjunct to conventional root canal therapy aims to maximize the antimicrobial effect, reducing the treatment time and increasing the success rates. PAD has proved to be effective against endodontic microorganisms, even when organized in biofilms (14). Besides, it acts in a selectively way. The photosensitizer stains the bacterial cells in soft and hard tissues. The photo-activated cells release molecular oxygen causing disruption of the bacterial cell wall. Both photosensitizer and oxygen released during bacterial cell death do not exhibit toxicity to the patient (20).

Although NaOCl is the irrigating solution of choice, the effective removal of biofilm requires a direct contact with the microorganisms, a greater volume of the solution, high concentrations and contact time that requires a prolonged treatment time (21). All these factors directly imply in increased toxicity and adverse side effects. Therefore, the present study carried out an histological evaluation of a single visit root canal treatment of dog's teeth with apical periodontitis using 400 ppm Sterilox, 2% and 5% NaOCl, with and without PAD. The hypothesis tested were that Steriox, when used in a higher concentration and in the clinical conditions could present histological findings similar to NaOCl and better than saline solution and that PAD when used after chemo-mechanical preparation could present lower scores for apical inflammation than the group without PAD.

Methods

This study was performed in accordance with the Ethical Committee for Animal Experiments (approval protocol CEUA 009/2011). A total of 134 root canals of upper and

lower premolars of 10 mongrel dogs (ages between 12-18 months year-old) were selected. In each phase of study, animals were anesthetized intramuscularly (IM) using 1 mg/kg of 0,2% acepromazine (Eurofarma, São Paulo, SP, Brazil) and then intravenously (IV) using 8 mg/kg of 1% propofol (Eurofarma, São Paulo, SP, Brazil) and 3 to 4 µg/kg of fentanyl (Eurofarma, São Paulo, SP, Brazil). The dose was supplemented IV using 4 mg/kg of propofol and 3 µg/kg of fentanyl every 30 minutes. After the procedures, the animals received IM 2 mg/kg of tramadol hydrochloride (Eurofarma, São Paulo, SP, Brazil) every 12 hours for analgesia.

Dental procedures were carried out by a specialist in endodontics. Access cavities were made in the mesial and distal fossas of the occlusal surface of right and left upper and lower premolars. The working length (WL) was established at 1 mm short to the radiographic apex using a #20 K-file (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Switzerland). The pulp was removed and the apical foramen was disrupted and enlarged up to #30 K-file at the radiographic apex. Root canals were left open for 2 weeks and then sealed using zinc oxide/eugenol cement (IRM, Dentsply Ind. e Com. LTDA., Petropolis, Brazil) (22).

After 60 days, the dogs were randomly divided according to the treatment groups, which consider the use of PAD and the treatment protocol as follows:

- without PAD (n=5): SX (400 ppm Sterilox), SH2 (2% NaOCl), SH5 (5% NaOCl) and SS (saline solution) - positive control.
- with PAD (n=5): SX/PAD, H2/PAD, H5/PAD and SS/PAD

The root canals were prepared with K-files at the WL up to #55 size. At every instrument change, canals were flushed with 2 mL of one irrigation solution using a disposable 10-mL syringe (BD Surgical Industries Ltd.) and a 30-gauge needle

(Ultradent ref. 349 IJP - Ultradent Products Inc, USA) at 2 mm short from WL. After preparation, canals were flushed with 2 mL of 17% EDTA (Biodinamica, Ibiporã, PR, Brazil) that was left for 3 min into the canal with manual agitation using a #50 K-file followed by a flush of 2 mL SS. The canals were dried with sterile #55 paper points (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Switzerland). In the PAD group, the canals were filled with toluidine blue solution (12,7 mg/mL, pH 5) using a 10-mL disposable syringe and a 30-gauge needle and agitated for 60 s using a #50 K-file inserted up to the WL. PAD-Plus (Dexcel Dental, Daventry, UK) was used in the parameters of 635 nm, 100 mW and 15 J. The flexible optical fiber was introduced up to 2 mm short from the WL and withdrawn to coronal third. This movement was repeated during 120 s. After irradiation, canals were washed with 2 mL of SS and dried with paper points. All canals were filled according to Tagger's technique using gutta-percha points (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Switzerland) and AH Plus sealer (Dentsply Maillefer, De Trey, Germany). The access cavities were sealed with silver amalgam.

Four months after endodontic treatment, the animals were euthanized using an anesthetic overdose followed by a 10% formalin buffer solution perfusion. Then, the maxillaries were separated, dissected and kept immersed in 10% formalin buffer solution.

Histologic processing and analysis

The jaws were sectioned to obtain individual roots and demineralized in 5% nitric acid. After embedded in parafin, areas showing apical foramen disruption and periapical region were serially sectioned in a 5 µm thickness and stained with hematoxylin and eosin.

Histologic Analysis

The sections were analyzed (40X to 400X magnification) by a calibrated (Kappa = 0.889 ± 0.061 ; $P < .05$) and blinded evaluator, under light microscopy (Nikon Eclipse E200, Nikon Corp., Tokio, Japan) and classified according to the ascending order of inflammation severity (23) (Figures 1, 2 and 3):

- 0- absence of inflammation;
- 1- mild: sparse mononuclear cells;
- 2- moderate: infiltrate of mononuclear cells and/or sparse neutrophils and eosinophils;
- 3- severe: infiltrate of polymorphonuclear neutrophils or eosinophils.

Statistical Analysis

Data was statistically analyzed by nonparametric Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests. The significance level was set at $\alpha = .05$.

Results

According to table 1, when irrigating solutions were compared (columns) SH5, SH2 and SX without PAD presented statistical differences from SS group ($P = .02$), that presented the greatest scores for apical inflammation. The histopathological evaluation

of periapical region of SS group demonstrated the presence of great microcavities of acute inflammatory infiltrate and areas of resorption in the apical cementum (Figure 3). Although the SH5/PAD group (Figure 1) presented the lowest scores for apical inflammation, it was not statistically significant. When the irrigating solutions with PAD were compared they were statistically equivalent. Thus, the findings for apical inflammation in SX group could be statistically compared to SH5 and SH2 groups as SX/PAD could be compared to SH5/PAD and SH2/PAD.

When the effect of PAD was evaluated for each irrigating solution (lines), there were no significant differences in the scores of inflammation, although PAD use has showed lower scores for inflammation than when it was not used.

Discussion

Endodontic therapy in a single visit is desirable to avoid re-colonization and re-infection of the root canal system by repeated appointments and inadequate coronal sealing. Thus, effective disinfecting protocols capable of achieving the treatment in a few visits as possible have been intensively studied in the last years (19, 24).

This *in vivo* model tried to simulate the human conditions involving a polymicrobial root canal infection with AP. Through this protocol, evaluation of the apical cellular response to different disinfecting protocols which could be used as an adjunct to chemo-mechanical debridement was carried out.

According to the results of this study, all canal irrigating solutions (2% NaOCl, 5% NaOCl and 400ppm Sterilox), used isolated were more effective than SS. In the PAD group no statistical differences were found between the irrigating solutions. Thus, Sterilox may be considered an alternative to NaOCl in root canal treatment, since

Sterilox showed no statistical differences from 2% and 5% NaOCl in the scores for apical inflammation.

Lately many studies have shown that the disinfecting actions of super-oxidized waters are heavily reduced in the presence of organic contamination (13, 15, 25). The high levels of organic load present in the root canals, as in the biofilm structure, particularly in the extracellular polymeric matrix, competitively quenched the reactive oxidants of super-oxidized waters that are responsible for its antimicrobial activity (25). Thus, the usual concentration of Sterilox was duplicated in the present research, trying to overcome this disadvantage.

A sufficient concentration and exposure time would be required to reach cells deeper within the biofilm architecture (14, 25). Most of studies *in vitro* (13) about the antimicrobial effect of Sterilox do not have the contact time nor simulate the clinical conditions where the irrigating solution is used. When the mechanical preparation is achieved with the use of an irrigating solution, its antimicrobial effect may be improved. The instrumentation helps to introduce the solution into the apical part of root canal, to remove organic and inorganic contents and to disrupt the structures of biofilms allowing a better action of irrigating solution. It seems that besides the greater concentration of Sterilox used in this research, the use in the clinical conditions had improved its effect. The results also suggest that differences could be found when the effect of an irrigating solution is tested during the chemo-mechanical preparation or only by flushing or by contact. Rossi-Fedele *et al.* (13) evaluated the antimicrobial effect of irrigation using 200 ppm Sterilox and 5% NaOCl isolated without mechanical preparation of root canals bovine contaminated with *Enterococcus faecalis*. Only 5% NaOCl showed effectiveness. As the authors suggest, perhaps in the presence of a reduced bacterial load, as a result of a chemo-mechanical preparation, the super-oxidized water irrigation might have

clinically relevant results.

Histopathological evaluation showed that intense inflammatory response, areas of abscess and cementum resorption were more frequently found in control group (SS), demonstrating the need of use of irrigating solutions with antimicrobial properties.

The best results were obtained for SH5/PAD group, presenting the lower scores for inflammation, even without statistical significance to others groups. This is in accordance with other studies (13, 26) that also found that concentrated NaOCl have greater antibacterial effect.

Also, gram-negative microorganisms release endotoxin from their cell walls that can begin or enhance inflammatory response (27). According to Dwyer and Torabinejad (28), substances that are highly alkaline, such as NaOCl, are able to detoxify endotoxin. Researches have shown the efficacy of 5% NaOCl on endotoxins (22, 27).

The effect of PAD immediately after root canal chemo-mechanical preparation, as a supplement, which is the main proposed protocol in endodontics (29) was also evaluated. According to Souza *et al.* (24), instrumentation and irrigation modify the environmental of root canal and may disrupt biofilms structures, making the bacterial community more susceptible to the action of PAD. Also, the effect of PAD is expected in the areas where the instruments and irrigating solutions do not penetrate, complementing the disinfection in the residual microorganisms.

According to results, the PAD did not cause significantly differences in the scores for apical inflammation in the groups irrigated with NaOCl, Sterilox nor SS. These results are in accordance with those found in the study *in vitro* of Souza *et al.* (24). The authors (24) suggested that these findings could be due to the fact that the effect of PAD was

probably restricted to the same root canal areas already affected by the irrigating solutions.

Recently, Silva *et al.* (19) have investigated the antimicrobial effect of PAD *in vivo*. The authors evaluated the apical response to PAD alone and with the chemo-mechanical debridement in root canals of dogs teeth with AP. They found better results in the PAD with chemo-mechanical preparation group, where the periapical region was free of inflammatory cells and showed moderate neoangiogenesis. The methodology was quite similar to the present study, despite some differences that could have influenced the results. They used phenothiazine chloride as photosensitizer and 2,5% NaOCl, a lower concentration, as irrigating solution. Another factor is that the mechanical preparation in the present study was performed up to #55 size . Maybe the greater apical preparation with high concentrated irrigating solutions achieved in this work could be responsible for the absence of significant differences for PAD therapy.

Egan *et al.* (30) have demonstrated that the light transmission through the tooth tissue at the operating wavelength used appears to be good and attenuation in sound dentine is minimal with up to 3 mm thick dentine slices. Also, Bonsor *et al.* (31) have shown that the photosensitizer has good wettability properties. Perhaps, even after root canal instrumentation, the photosensitizer could not penetrate well into irregularities, dentinal tubules or in untouched biofilms in canal walls. As the action of PAD is limited by the areas reached by the dye, its effect becomes limited. So, a PAD protocol to be used as an effective antibacterial supplement to chemo-mechanical therapy remains to be established.

Studies *in vivo* (19, 31-32) and *ex vivo* (33) have suggested the potential of PAD as an adjunctive technique to eliminate residual root canal bacteria after chemo-mechanical preparation. According to Ng *et al.* (33), in an *ex vivo* study, PAD mediated

by toluidine blue significantly enhanced the effect of chemo-mechanical debridement in teeth with necrotic pulps and offered a means of destroying remaining microorganisms.

The lack of statistical significance of the effect of PAD showed in the present research could have been influenced by the size of the sample that was limited due to difficulties of an *in vivo* study. But another point to be considered, is that most of studies that have shown adequate root canals disinfection when PAD was used isolated (17, 32) or combined with chemo-mechanical debridement (32-34) sampled with paper points or aspiration of the root canal content. These methods are limited by only sampling planctonic bacteria. They do not take in account bacteria organized in biofilms and inside dentinal tubules.

In the present study, after been left opened for oral environmental for 2 weeks the root canals were sealed and left for 2 months. Up to date, most of the studies that evaluated PAD did not reached this time for microbial development in the root canal system. So, we can speculate that the content of these canals was more complex presenting greater difficulties for microbial eradication. Also, the apical cellular response to Sterilox has not been investigated *in vivo* until now. This is the first study to show the histopathological analysis of this irrigating solution been used in the chemo-mechanical preparation in a greater concentration. Based in the results exposed herein the effects of PAD seems to have no clinical relevance. Perhaps some adjustments in the protocol should be tested like, for example, the use of ultrasonic waves for a better photosensitiser penetration in the root canal system and in the biofilms.

Conclusion

Within the experimental conditions used and the results presented, this study suggests that PAD did not show any clinical relevance for the treatment of root canal with pulpal necrosis and apical periodontitis. The irrigating solution 400 ppm Sterilox may be considered an alternative to NaOCl in root canal treatment.

References

1. 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* 1997;30: 297-306.
2. Nair PNR, Henry S, Cano V, Vera J. Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after 'one-visit' endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005;99:231–52.
3. Naenni N, Thoma K, Zehnder M. Soft tissue dissolution capacity of currently used and potential endodontic irrigants. *J Endod* 2004;30:785–7.
4. Sirtes G, Waltimo T, Schaetzle M, Zehnder M. The effects of temperature on sodium hypochlorite short-term stability, pulp dissolution capacity, and antimicrobial efficacy. *J Endod* 2005;31:669–71.
5. Siqueira J, Batista M, Fraga R, de Uzeda M. Antibacterial effects of endodontic irrigants on black-pigmented gram-negative anaerobes and facultative bacteria. *J Endod* 1998;24:414–6.
6. Gatot 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;17:573–4.
7. White JD, Lacefield WR, Chavers LS, Eleazer PD. The effect of three commonly used endodontic materials on the strength and hardness of root dentin. *J Endod* 2002;28:828-30.

8. Berutti E, Angelini E, Rigolone M, Migliaretti G, Pasqualini D. Influence of sodium hypochloride on fracture properties and corrosion of ProTaper Rotary instruments. *Int Endod J* 2006;39:693-9.
9. Martin MV, Gallagher MA. An investigation of the efficacy of super-oxidized (Optident/Sterilox) water for the disinfection of dental unit water lines. *Br Dent J*. 2005;198:353-4.
10. Fukuzaki S. Mechanisms of actions of sodium hypochlorite in cleaning and disinfection processes. *Biocontrol Sci*. 2006;11:147-57.
11. Solovyeva AM, Dummer PM. Cleaning effectiveness of root canal irrigation with electrochemically activated anolyte and catholyte solutions; a pilot study *Int Endod J* 2000;33:494-504.
12. Garcia F, Murray PE, Garcia-Godoy F, Namerow KN. Effect of aquatine endodontic cleanser on smear layer removal in the root canals of ex vivo human teeth. *J Appl Oral Sci* 2010;18:403-8.
13. Rossi-Fedele G, Figueiredo JAP, Steier L, Canullo L, Steier G, Roberts AP. Evaluation of the antimicrobial effect of super-oxidized water (Sterilox®) and sodium hypochlorite against *Enterococcus faecalis* in a bovine root canal model. *J Appl Oral Sci* 2010;18:498-502.
14. Dobson J, Wilson M. Sensitization of oral bacteria in biofilms to killing by light from a low-power laser. *Arc Oral Biol* 1992;37:883-7.
15. Rossi-Fedele G, Steier L, Dogramaci EJ, Canullo L, Steier G, de Figueiredo JA. Bovine pulp tissue dissolution ability of HealOzone®, Aquatine Alpha Electrolyte® and sodium hypochlorite. *Aust Endod J* 2013;39:57-61.
16. Cheng X, Guan S, Lu H, Zhao C, Chen X, Li N, Bai, Q, Tian Y, Yu Q. Evaluation of the Bactericidal Effect of Nd:YAG, Er:YAG, Er,Cr:YSGG Laser Radiation, and Antimicrobial Photodynamic Therapy (aPDT) in Experimentally Infected Root Canals. *Lasers Surg Med* 2012;44:824-31.
17. Bago I, Plecko V, Panduric DG, Schauperl Z, Baraba A, Anic I. Antimicrobial efficacy of a high-power diode laser, photo-activated disinfection, conventional and sonic activated irrigation during root canal treatment. *Int Endod J* 2013;46:339-347.
18. Stojcic S, Amorim H, Shen Y, Haapasalo M. Ex vivo killing of *Enterococcus faecalis* and mixed plaque bacteria in planktonic and biofilm culture by modified photoactivated disinfection. *Int Endod J* 2013;46:649-659.
19. Silva LAB, Novaes AB, Oliveira RR, Nelson-Filho P, Santamaria M, Silva RAB. Antimicrobial photodynamic therapy for the treatment of teeth with apical periodontitis: a histopathological evaluation. *J Endod* 2012;38:360-6.

20. Soukos NS, Wilson M, Burns T, Speight PM. Photodynamic effects of toluidine blue on human oral keratinocytes and fibroblasts and *Streptococcus sanguis* evaluated in vitro. *Lasers Surg Med* 1996;18:253–9.
21. Haapasalo M, Shen Y, Qian W, Gao Y. Irrigation in endodontics. *Dent Clin North Am* 2010;54:291–312.
22. Tanomaru JMG, Leonardo M, Tanomaru Filho M, Bonetti Filho I, Silva LAB. Effect of different irrigation solutions and calcium hydroxide on bacterial LPS. *Int Endod J* 2003;36:733-9.
23. Moure SP, de Vargas KF, Borghetti RL, Salum FG, Cherubini K, da Silva VD, de Figueiredo MA. Clinical and pathological characteristics of polymethylmethacrylate and hyaluronic acid in the rat tongue. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2012;41:1296-303.
24. Souza LC, Brito PRR, Oliveira JCM, Alves FRF, Moreira E JL, Sampaio-Filho HR, Rôças, IN, Siqueira, JF. Photodynamic therapy with two different photosensitizers as a supplement to instrumentation/irrigation procedures in promoting intracanal reduction of *Enterococcus Faecalis*. *J Endod* 2010;36:292-6.
25. Thorn RMS, Lee SWH, Robinson GM, Greenman J, Reynolds DM. Electrochemically activated solutions: evidence for antimicrobial efficacy and applications in healthcare environments. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012;31:641–53.
26. Marais JT, Brözel VS. Electro-chemically activated water in dental unit water lines. *Br Dent J* 1999;187:154-8.
27. Silva LB, Leonardo, MR, Assed S, Tanomaru Filho M. Histological study of the effect of some irrigating solutions on bacterial endotoxin in dogs. *Braz Dent J* 2004; 15:109-14.
28. Dwyer TG, Torabinejad M. Radiographic and histologic evaluation of the effect of endotoxin on the periapical tissues of the cat. *J Endod* 1981;7:31-5.
29. Rios A, He J, Glickman GN, Spears R, Schneiderman ED, Honeyman AL. Evaluation of photodynamic therapy using a light-emitting diode lamp against *Enterococcus faecalis* in extracted human teeth. *J Endod* 2011;37:856–9.
30. Egan J, Collis J, Pearson G J, Williams J. Transmission of 636nm Diode laser light through dentine. Colorado, USA: *Transaction of SPIE*, 2000.
31. Bonsor SJ, Nichol R, Reid TM, Pearson GJ. An alternative regimen for root canal disinfection. *Br Dent J* 2006;201:101-5.
32. Garcez AS, Nuñez SC, Hamblin MR, Ribeiro MS. Antimicrobial effects of photodynamic therapy on patients with necrotic pulps and periapical lesion. *J Endod* 2008;34:138–42.
33. Ng R, Singh F, Papamanou DA, Song X, Patel C, Holewa C, Patel N, Klepac-Ceraj

V, Fontana C, Kent R, Pagonis TC, Stashenko PP, Soukos NS. Endodontic Photodynamic Therapy Ex Vivo. *J Endod* 2011;37:217–22.

34. Schlafer S, Vaeth M, Hørsted-Bindslev P, Frandsen EVG. Endodontic photoactivated disinfection using a conventional light source: an in vitro and ex vivo study *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010;109:634-41.

List of Figures:

Figure 1 (A) SH5/PAD: periapical region showing mild and sparse mononuclear cells (score 1) (hematoxylin-eosin, original magnification x40). (B and C) Higher magnification of the area made in figure A (hematoxylin-eosin, original magnification x100 and x400, respectively).

Figure 2 (A) SH2 group: the apical region showing moderate infiltrate of mononuclear cells and sparse neutrophils and eosinophils (score 2) (hematoxylin-eosin, original magnification x40). Arrow indicates presence resorption areas. (B) Higher magnification of the area demarked in figure A (hematoxylin-eosin, original magnification x100).

Figure 3 (A) SS group: periapical region showing severe inflammatory reaction (score 3). Note the presence of resorption areas (black arrow) (hematoxylin-eosin, original magnification X40). (B, C and D) Higher magnification of the areas made in figure A. White arrow indicates abscesses areas, associated to infiltrate of degenerated polymorphonuclear neutrophils (*). (hematoxylin-eosin, original magnification x100, X200 and x400, respectively).

Figure 1

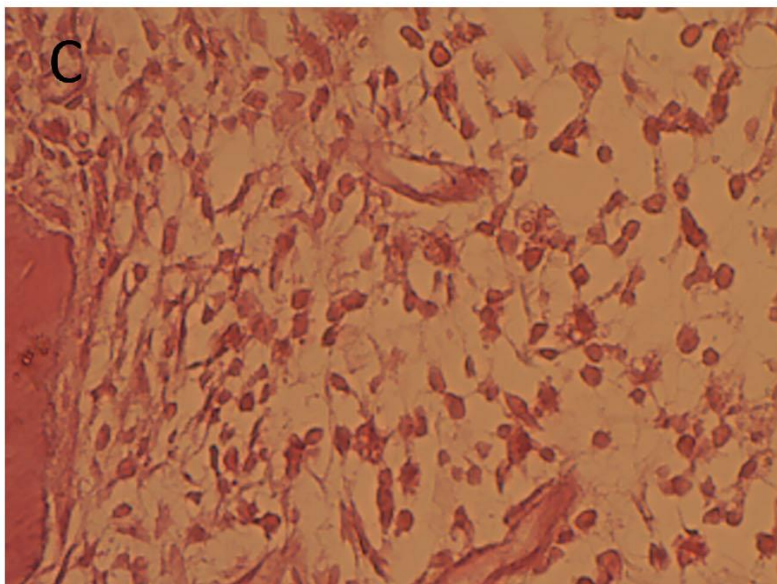
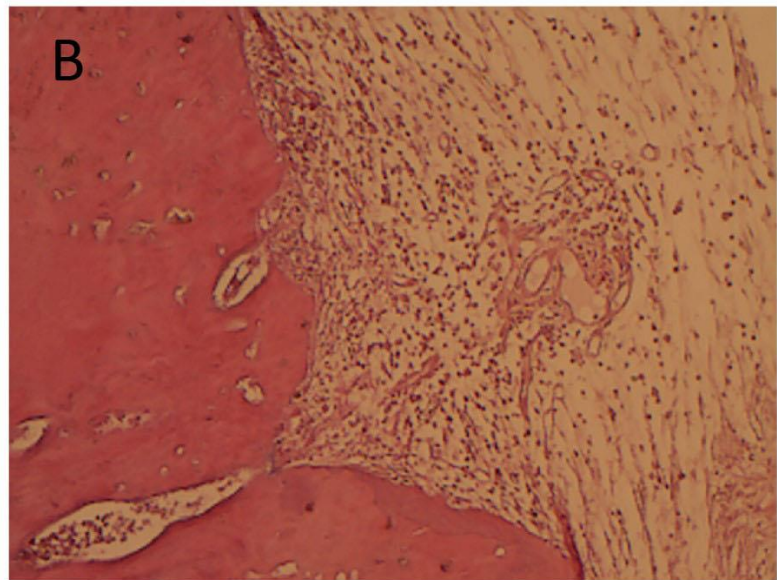
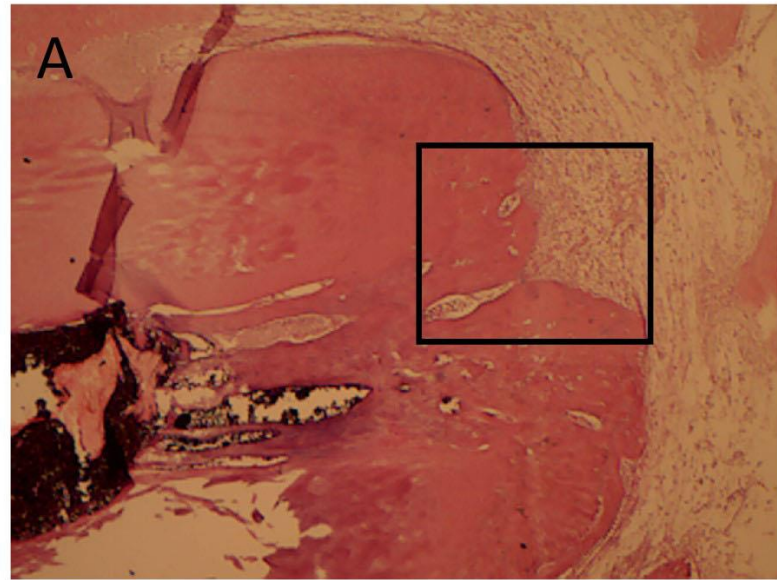


Figure 2

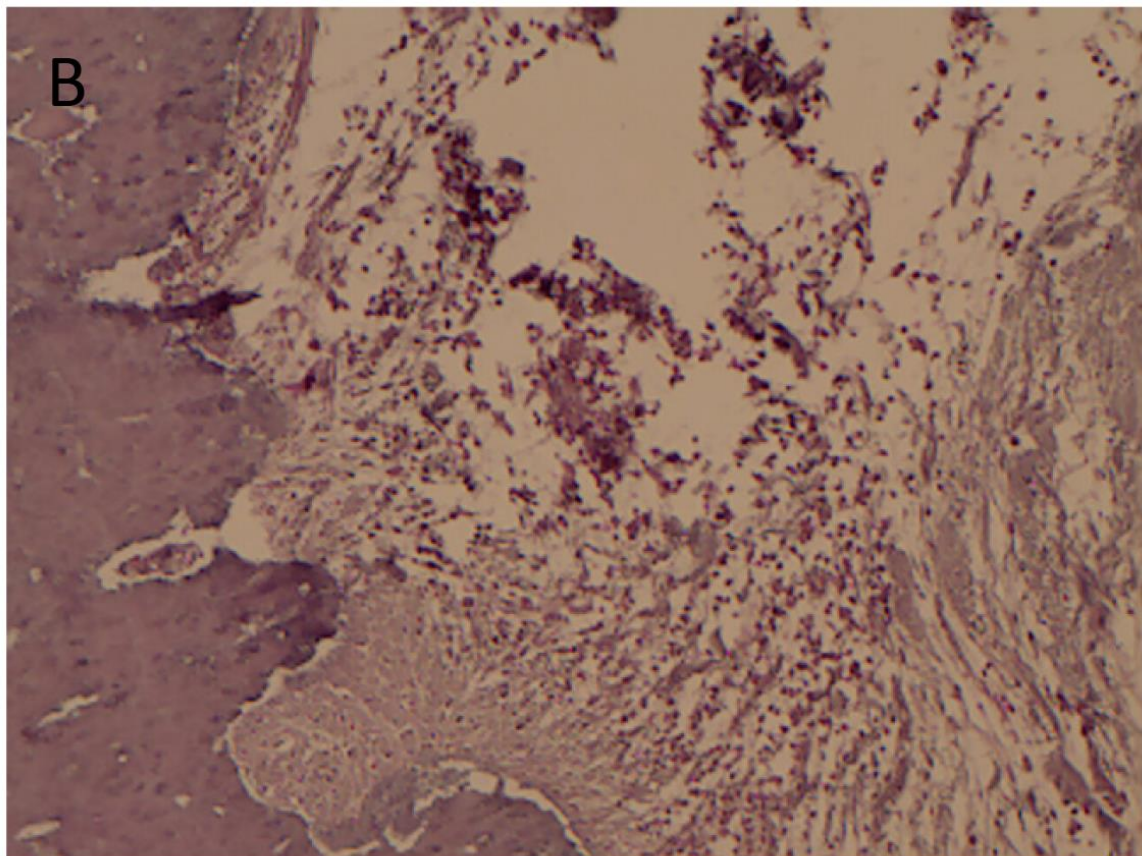
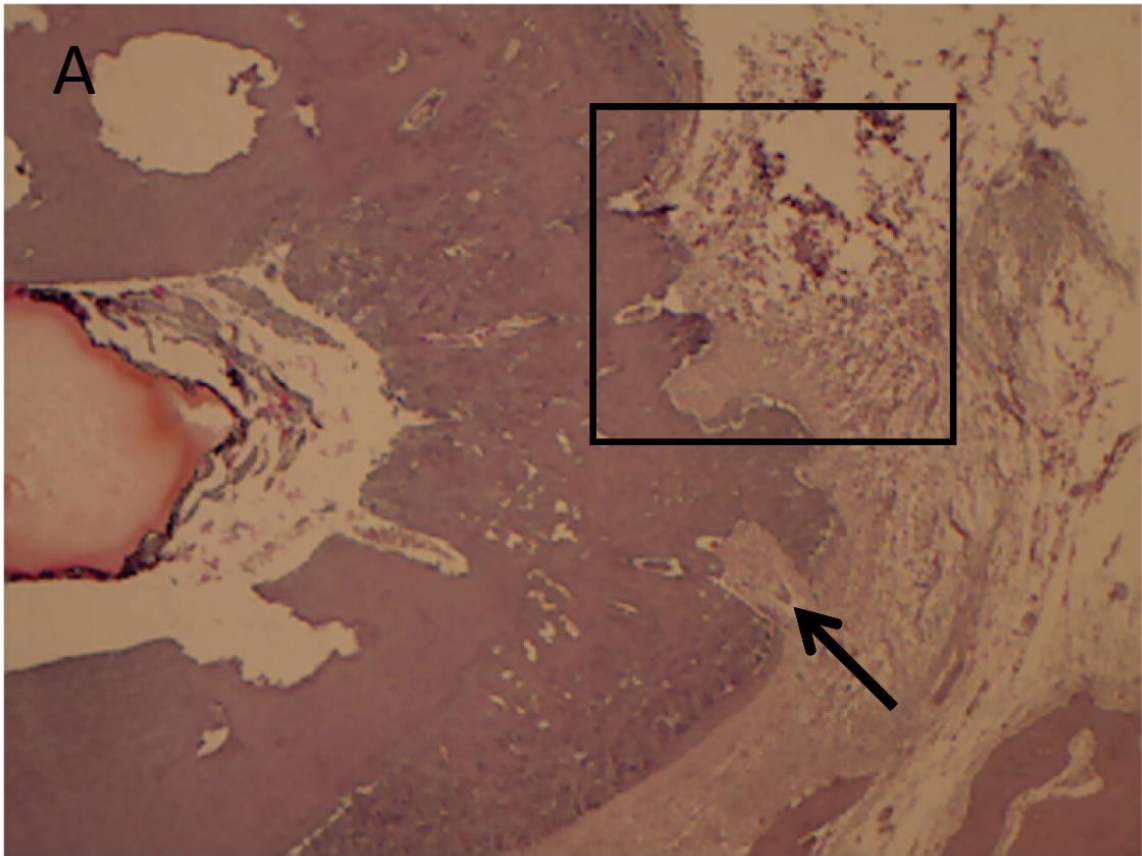


Figure 3

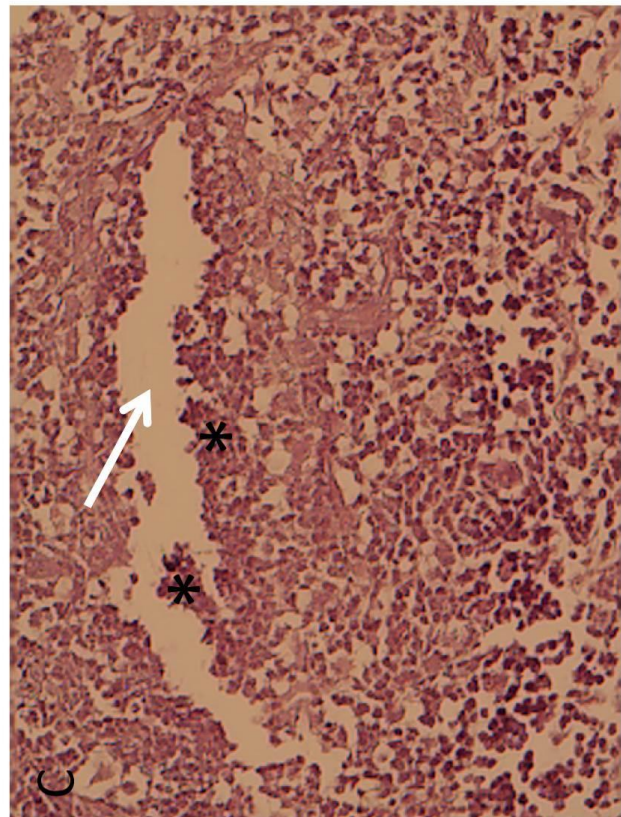
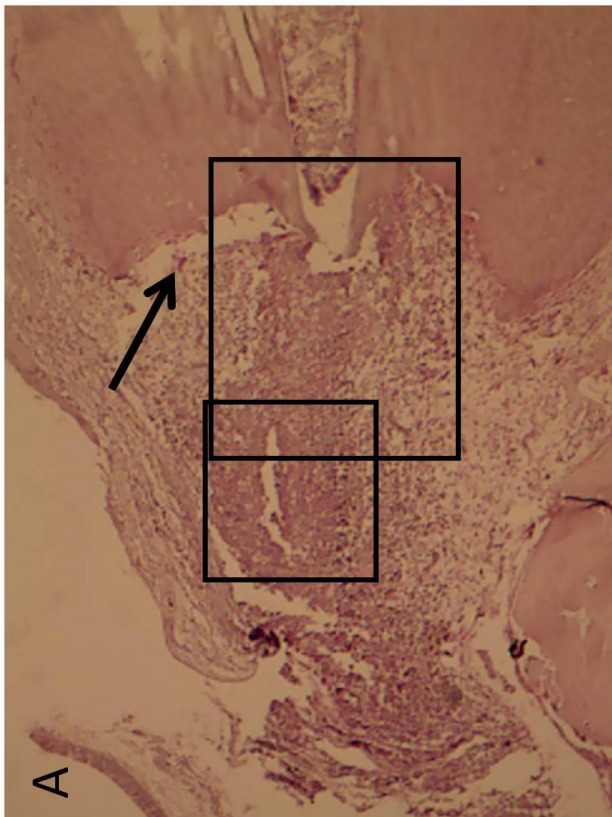
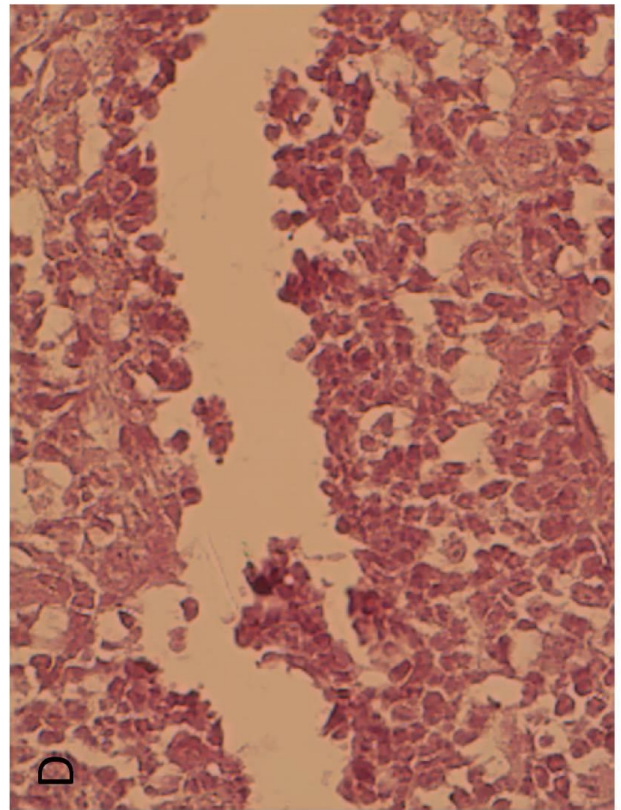
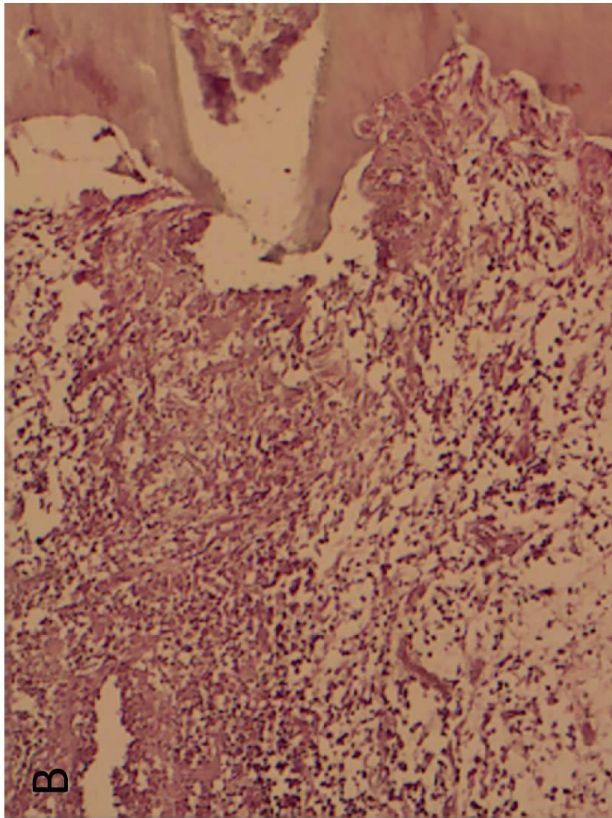


Table 1. Distribution of cases according to the histological scores: comparison among irrigating solutions and between each solution with and without PAD

Irrigating Solutions	Histological Scores	PAD				P*
		Without PAD		With PAD		
		n	%	n	%	
SH5	Score 0	-	-	-	-	0.209
	Score 1	7	33.34	9	52.95	
	Score 2	12	57.14	8	47.05	
	Score 3	2	9.52	-	-	
Total		21 ^{Aa}	100.00	17 ^{Aa}	100.00	
SH2	Score 0	1	6.67	1	4.78	0.899
	Score 1	4	26.67	4	19.04	
	Score 2	7	46.66	15	71.42	
	Score 3	3	20.00	1	4.76	
Total		15 ^{Aa}	100.00	21 ^{Aa}	100.00	
SX	Score 0	2	11.12	-	-	0.828
	Score 1	6	33.33	7	35.00	
	Score 2	6	33.33	11	55.00	
	Score 3	4	22.22	2	10.00	
Total		18 ^{Aa}	100.00	20 ^{Aa}	100.00	
SS	Score 0	-	-	-	-	0.107
	Score 1	-	-	2	16.67	
	Score 2	4	40.00	7	58.33	
	Score 3	6	60.00	3	25.00	
Total		10 ^{Ba}	100.00	12 ^{Aa}	100.00	

Capital letters (columns) demonstrate statistical differences among the irrigating solutions (P=.02).

Lower case letters (lines) demonstrate the absence of statistical differences between each solution with and without PAD (P* > .05)

3. Capítulo II

Artigo 2

*Accuracy of cone beam computed tomography and periapical radiography in apical
periodontitis diagnosis*

Formatado conforme diretrizes do periódico *Journal of Endodontics*, Qualis A1 e Fator de impacto 2.929

Accuracy of cone beam computed tomography and periapical radiography in apical periodontitis diagnosis

Fernanda Ullmann López, MSc,¹ Patrícia Maria Poli Kopper, PhD,² Carolina Cucco, MSc,¹ Alvaro Della Bona, PhD,³ José Antônio Poli de Figueiredo, PhD,¹ Fabiana Vieira Vier-Pelisser, PhD.¹

1. Post-Graduate Program of Dentistry, School in Dentistry, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

2. Post-Graduate Program in Dentistry, School of Dentistry, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

3. Post-Graduate Program in Dentistry, School of Dentistry, University of Passo Fundo, Passo Fundo, RS, Brazil.

Corresponding author:

Name: Fernanda Ullmann López

Post-Graduate Program in Dentistry, School of Dentistry, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul

Address: 6681 Ipiranga Av.

Postal Code: 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil

Tel./Fax: +55 51 3026 7311 / +55 51 8409 0044

E-mail: fernanda.ullmann.lopez@gmail.com

Abstract

Introduction: This study aimed to investigate the correlation and the agreement between periapical radiography (PR) and cone beam computed tomography (CBCT) and their correlation with the histological findings in the diagnosis of apical periodontitis (AP).

Methods: 134 premolar root canals from 10 dogs were endodontically treated after AP induction. Four months later, the animals were euthanized and standard digital PRs were obtained. The area of AP was measured using ImageJ software. CBCT (i-CAT) images from each arch were obtained and AP area and volume were measured using Osiri-X software. The apical inflammatory infiltrate was evaluated under light microscopy. The correlation between imaging methods was evaluated by Pearson's coefficient and the Bland-Altman's (BA) method was used to assess the agreement between PR and CBCT data. The correlation between imaging data and histology was assessed by Spearman coefficient. **Results:** Despite a strong correlation between PR and CBCT areas, the limits of agreement were very broad (95%: 0.19 to 1.08). PR only measured on average 63% of CBCT values. Although the strong correlation between PR area and CBCT volume, BA suggests that the larger the CBCT volume the more underestimated the PR value. When APs had volumes smaller than 6 mm³, the PR estimates of CBCT data were unpredictable. The correlation between PR area, CBCT area, CBCT volume and histology data was significant. **Conclusions:** The diagnosis of AP based on PR data is clinically limited and it should not be used for scientific investigations.

Key-words: apical periodontitis, computed tomography, periapical radiography, endodontics

1. Introduction

The diagnosis of periapical disease, as well as its post-treatment follow-up and determination of success rates are usually assessed by periapical radiography (PR) (1-3). In current systematic reviews on the outcome of root canal treatment, which represent a high quality evidence, PR was used in all clinical studies (3-5).

Radiography (PR) offers a 2-dimensional image from three-dimensional structures (6). As a result of superimposition and geometric distortion of structures there is loss of information from conventional and digital PR (7-10). Apical periodontitis (AP) confined within the cancellous bone may not be shown by PR (6) as well as the thickness of the cortex covering the lesion, which can greatly influence its detection (1, 6, 11-14). Additionally, radiographic interpretation is more difficult when the background pattern is complex (15).

Cone beam computed tomography (CBCT) has enabled an earlier detection and more accurate evaluation of AP than PR (9, 16-20). Nearly 62% more AP is detected in posterior teeth according to current literature (21-22). Earlier detection of the disease enables earlier treatment, which will most likely result in a better prognosis (17). Another advantage of CBCT is the ability to determine the full extent of AP in relation to other structures, allowing the clinician to select an adequate treatment plan and offering a more reliable follow-up.

In addition, when patient symptoms are inconclusive and the PR shows no evidence of disease, CBCT is a suitable option to further investigate the case (17). Some studies reported on the superiority of CBCT compared with PR to detect the full AP's extent (4, 10, 16).

Clinically, to compare a new measurement technique with an established one is often necessary to verify whether they agree sufficiently for the new to replace the old (23). Many studies give the product-moment correlation coefficient between the results of the two measurement methods as an indicator of agreement, but this high correlation does not mean that the two methods agree. Bland and Altman (BA) plots are extensively used to evaluate the agreement among two different measurements techniques that each provide some errors in their measure (24). These plots allow us to investigate the existence of any systematic difference between the measurements and to identify possible outliers.

The histological findings are considered the gold standard in AP diagnosis. The comparison between imaging methods and histology allows the evaluation of their sensitivity and specificity. However, histology cannot be considered an appropriate method for measuring the AP extent, especially its volume.

The present study was designed to investigate the ability of PR adequately contributing on the diagnosis of AP, assisting on acceptable treatment planning and evaluation of the outcome. Therefore, the objective of this study was to investigate the correlation and agreement between PR and CBCT imaging data and their correlation with the histological findings collected from induced AP lesions, suggesting the predicting power of the PR for AP diagnosis. The hypothesis tested was that there is poor correlation and agreement between PR and CBCT images for adequate AP diagnosis.

2. Materials and Methods

This study was performed in accordance with the Ethical Committee for Animal

Experiments (CEUA 009/2011). A total of 134 mesial and distal root canals of upper and lower premolars from 10 mongrel dogs (12-18 months-old) were used. In each phase of the study, animals were anesthetized intramuscularly using 1 mg/kg of 0,2% Acepromazine and 8 mg/kg of 1% Propofol (Eurofarma, São Paulo, SP, Brazil) and 3 to 4 µg/kg of Fentanyl (Eurofarma, São Paulo, SP, Brazil) intravenously. The dose was supplemented intravenously with 4 mg/kg of Propofol and 3 µg/kg of Fentanyl every 30 minutes, thereafter the animals received 2 mg/kg of tramadol hydrochloride every 12 hours for analgesia.

Dental procedures were carried out by an endodontist. Access cavities were made in the mesial and distal fossas of the occlusal surface and the working length was established at 1 mm short to the radiographic apex using a # 20 K-file. The pulp was removed and the apical foramen was disrupted and enlarged up to #30 K-file at the radiographic apex. Root canals were left open for 2 weeks and then sealed using zinc oxide/eugenol cement (IRM, Dentsply Ind. e Com. LTDA., Petropolis, Brazil) (25).

After 2 months, root canal treatments were performed in a single visit and access cavities were sealed with amalgam (Velvalloy, SS White LTDA., Rio de Janeiro, Brazil). After 4 months, the animals were euthanized using an anesthetic overdose followed by a formalin buffer solution perfusion and the maxillaries were separated and dissected.

2.1 Imaging assessment

Standard digital PRs were taken before treatment at 120 days after endodontic treatment. A digital imaging sensor CDR Elite 4.5.0.99 (Schick Technologies Inc, Long Island City, USA), size 2, was adapted in a custom-made sensor holder and used in a parallel technique. A Timex-70 (Gnatus, Ribeirão Preto, Brazil) x-ray unit set at 70 KVp,

10 mA in a 0.2 -0.4 s time exposure, was used according to bone thickness. A 15-cm focal distance was used. The properties of the digital PR images were 12-bit resolution (4096 grey shades), 30 microns per pixel, edge high enhancement and a 1200x854 resolution. PR images were saved as uncompressed 12-bit tiff files.

The parameters of acquisition were adjusted on the basis of periodontal ligament and the trabecular pattern of the bone.

A CBCT of each arch was taken 120 days after endodontic treatment and samples were scanned using the i-CAT CBCT unit (Imaging Sciences, Hatfield, PA) set at 120 KVp, 5 mA with a 16-cm field of view (FOV) at 0.2-mm voxel. The exposure time was 26.9 s.

2.2 Imaging analysis

A single experienced and previously calibrated endodontist (ICC=0.89) held two separate viewing sessions for all radiographic and tomographic exams separated by a two-week interval. The images were evaluated with Mac OSX 10.8.3 software (Apple, Inc, Cupertino, CA, USA) and displayed on a 15-inch LCD monitor (NVIDIA GeForce GT 650M) at a resolution of 1280 x 800 pixels and 128 pixels depth of graphic card. Interpretation was carried out under a light ambience of 30-40 lux. The PR images were exported to ImageJ 1.47 software (National Institutes of Health, Bethesda, MD) and the area of AP was measured (in mm²) as previously described (26). Briefly, after calibrating the scale of the software according to the size of the sensor's active area (36 mm x 25,mm), the borders of AP were outlined using the freehand selection tool (Figure 1a).

The CBCT DICOM files were exported to Osiri-X 5.6 software (Open-source

DICOM viewer <http://www.osirix-viewer.com>). The borders of each AP were outlined in all sagittal slices (ROI) using the closed polygon tool. After selection, a name was given to the series of ROI's using the ROI rename tool in the ROI menu. Then, missing ROI's were generated in the series and the volumetric data (mm^3) was acquired (27) (Figure 1c). The area (mm^2) of the major sagittal section of each lesion was measured (Figure 1b).

2.3 Histological processing

The jaws were sectioned to obtain individual roots and demineralized in 5% nitric acid. After embedded in parafin, specimens were serially sectioned in a 5 μm thickness and stained with hematoxylin and eosin.

2.4 Histological analysis

The sections showing apical foramen disruption and periapical region were analysed (40X to 400X magnification) by a calibrated (ICC=0.88) and blinded evaluator, under light microscopy (Nikon Eclipse E200, Nikon Corp., Tokio, Japan) and classified according to the ascending order of inflammation severity: 0-absence of inflammation, 1-mild: sparse mononuclear cells, 2-moderate: infiltrate of mononuclear cells and/or sparse neutrophils and eosinophils, 3-severe: infiltrate of polymorphonuclear neutrophils or eosinophils (28) (Figure 2).

2.5 Statistical analysis

The intra-observer measurements reliability was calculated using Intraclass Correlation Coefficient (ICC).

Correlation between methods was evaluated by Pearson's product-moment coefficient on log-transformed data. Assessment of agreement between PR and CBCT areas as well as PR area and CBCT volume was determined through the BA's method (23) and was used with ratios (Rx/CBCT) because the variance of bias was not constant. As CBCT is the standard reference method, ratios were therefore plotted against CBCT values instead of against averages (29). All estimates of correlation and agreement were obtained using random-effects models since the data was clustered, i.e., there was more than one observation of AP per experimental subject.

Correlation between PR and CBCT data with the histological scores was evaluated by Spearman coefficient.

The statistical analysis was performed using SPSS version 21.0.

3. Results

Despite of a strong correlation ($P < 0.001$; $r = 0.76$) between PR and CBCT areas (Figure 3a), the agreement was not conclusive (Figure 3b). Mean ratio bias was 0.63, suggesting that PR correlated with 63% of CBCT values. Additionally and more importantly, the range for the 95% limits of agreement (LA) of this bias was very broad (95% LA: 0.19 to 1.08) meaning that PR may estimate as low as 19% or as high as 108% of CBCT.

Figure 4a shows a strong correlation between PR area and CBCT volume ($P < 0.001$; $r = 0.72$); however, BA graphic between PR area and CBCT volume (Figure 4b) suggests that the larger the CBCT volume the more underestimated is its PR value. In any case, when AP volume was smaller than 6 mm^3 PR estimates of CBCT were unpredictable.

A significant ($P < 0.001$) and positive correlation was found between PR area, CBCT area, CBCT volume and histology data (Table 1); the higher the area/volume values, the higher scores in for apical inflammation in histology.

4. Discussion

Imaging data are an indirect method for AP diagnosis, as the assessment of true values by histology (gold standard) is not clinically possible. When PR and CBCT are compared, neither provides an unequivocally correct measurement (23), so the degree of agreement between them was assessed in the present study.

Initially the results suggested strong correlation between PR and CBCT areas ($r=0.76$) as well as between PR area and CBCT volume ($r=0.72$) in AP diagnosis. Therefore, it could give the impression that data from CBCT could be predicted by PR. However, upon evaluation of the BA statistical analysis, a considerable lack of agreement was found between the methods, highlighting a large variability of the data and the very low sensitivity of PR. Thus, larger areas of AP can be detected using CBCT in comparison with areas found in PR. It elucidates the complexity limiting the true extent of radiolucent images in PR despite its better detail of trabecular bone pattern and better resolution (30). Such results are in accordance with previous studies (9, 16, 18). When calculating the agreement between PR area and CBCT volume, the results showed that

the larger the CBCT volume the more underestimated is the PR value. Therefore, the results of this study strongly suggest that PR is not a suitable method to accurately predict data from CBCT in AP diagnosis.

Recently, a large number of studies have reported on the superiority of CBCT in detecting APs compared to PR (9-10, 16, 30-33). However, only a few of them have compared the ability of each method to demonstrate the full extent of the lesions (5, 10). As treatment planning and prognosis are mainly based on the extent of the lesion then simply its presence, as well as its post-treatment follow-up, access to such data must be considered of great importance. In addition, up to this date, studies have evaluated the accuracy of PR and CBCT by comparing average values from different therapies, not considering the differences between measuring methods (5, 10). Yet, the confidence interval of agreement is often not reported, so the variability of data and, consequently, the accuracy of methods could not be perceived. Results based only on average values can lead to inconsistent and unreliable information.

In the present study, the agreement between PR and CBCT was assessed using the random effects model applied through the BA method (23). Such method allows comparison between two techniques when there is more than one measurement per subject (dog). Ratios (used because bias was not constant) were plotted against CBCT data, since it was considered the reference method (29). BA's method provides a reliable measure of data behavior and variability. More important than the average value is the 95% confidence interval, which shows an interval within which 95% of the differences between measurements of the two methods are expected to lie. This method is very useful to show the relationship between average values and differences, as well as showing any systematic biases and identifies possible outliers.

Although histology is considered the gold standard in AP diagnosis, it can not be considered an accurate method to measure its area and volume. Thus, the correlation of imaging data and histological findings was used in this study as an attempt to demonstrate such relation, increasing the reliability of the data. Larger areas and volumes corresponded to the most severe scores of inflammation.

Ordinola-Zapata *et al.* (5) compared PR area with CBCT volume and found that PR was not only unreliable in detecting AP but also in showing its true extent. In addition, Ordinola-Zapata *et al.* (5) did not find a normal distribution of the data for the comparison between PR area and CBCT volume and did not find any correlation between these two methods using the same statistical test (Pearson's correlation coefficient), which agrees with the present study.

Tomographic and, especially, radiographic measurements are generally imprecise and associated errors should be quantified and contextualized (5, 32-33). The subjectivity of the evaluations, which are highly dependent on examiner accuracy, may affect results (5). Aiming to minimize human error in radiographic interpretation (34-35), only one experienced and calibrated endodontist performed all measurements in the present study. According to recent data (5), the sagittal sections of the hemi-arch give a more reliable determination of major AP extension, although using only the major sagittal area to evaluate AP can overestimate its actual size, since it does not consider the 3D-dimension (5). Therefore, in the present study, the major AP area measured in CBCT was taken in the sagittal aspect.

Information regarding the success rates of treatment procedures, dental materials, chemicals and medicines used in therapies may assist clinician on decision making. As most published studies on the clinical success of therapies is based on

radiographic exams (36) we should question about the effectiveness of current approaches/strategies. The data of the present study suggests that a more precise tool for the AP diagnosis is needed and the use of PR as a method of diagnosis, especially for scientific studies, is no longer acceptable.

The use of CBCT is still limited and is not considered a routine exam for endodontic therapy. It implies additional costs and a dose of radiation to the patient, and yet most practices do not have tomograph units. Nevertheless, as the use of tomography becomes more common in Dentistry, there is a greater chance of getting better quality devices with lower radiation doses and reduced costs.

5. Conclusion

Within the experimental conditions used and the results presented, this study strongly suggests that PR is not a reliable method to accurately predict data from CBCT for AP diagnosis and, therefore, the diagnosis of AP based on PR data is clinically limited and it should not be used for scientific investigations.

6. References

1 Bender IB, Seltzer S. Roentgenographic and direct observation of experimental lesions in bone: I. J Am Dent Assoc 1961;62:152-60.

2 Orstavik D, Kerekes K, Eriksen HM. The periapical index: scoring system for radiographic assessment of apical periodontitis. Endod Dent Traumatol 1986;2:20-34.

3 Trope M, Delano EO, Orstavik D. Endodontic treatment of teeth with apical periodontitis: single vs. multivisit treatment. J Endod 1999;25:345-50.

4 Wu MK, Dummer PMH, Wesselink PR. Consequences of and strategies to deal with

residual post-treatment root canal infection. *Int Endod J* 2006;39:343–56.

5 Ordinola-Zapatta R, Bramante CM, Duarte MH, Fernandes LMPSR, Camargo EJ, Moraes IG, et al. The influence of cone-beam computed tomography and periapical radiographic evaluation on the assessment of periapical bone destruction in dog's teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2011;112:272-9.

6 Huuonen S, Orstavik D. Radiological aspects of apical periodontitis. *Endod Topics* 2002;1: 3-25.

7 Murmulla R, Wortche R, Muhling J, Hassfeld S. Geometric accuracy of the NewTom 9000 Cone Beam CT. *Dentomaxillofac Radiol* 2005;34:28–31.

8 De Rossi A, De Rossi M, Rocha LB, da Silva LA, Rossi MA. Morphometric analysis of experimentally induced periapical lesions: radiographic vs histopathological findings. *Dentomaxillofacial Radiology* 2007;36:211-7.

9 Estrela C, Bueno MR, Leles CR, Azevedo B, Azevedo JR. Accuracy of cone beam computed tomography and panoramic and periapical radiography for detection of apical periodontitis. *J Endod* 2008;34:273-9.

10 Paula-Silva FWG, Hassan B, Silva LAB, Leonardo MR, Wu M. Outcome of root canal treatment in dogs determined by periapical radiography and cone-beam computed tomography scans. *J Endod* 2009;35:723-6.

11 Bender IB. Factors influencing the radiographic appearance of bone lesions. *J Endod* 1982;8:161-70.

12 Van Der Stelt PF. Experimentally produced bone lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1985;59:306-12.

13 Stabholz A, Friedman S, Tamse A. Endodontic failures and re-treatment. In: Cohen S, Burns RC, editors. *Pathways of the pulp*. 6th ed. St Louis: Mosby; 1994. p. 692–3.

14 Ricucci D, Bergenholtz G. Bacterial status in root-filled teeth exposed to the oral environment by loss of restoration and fracture or caries—a histobacteriological study of treated cases. *Int Endod J* 2003;36:787–802.

15 Kundel HL, Revesz G. Lesion conspicuity, structured noise, and film reader error. *AJR Am J Roentgenol* 1976;126:1233–8.

16 Lofthag-Hansen S, Huuonen S, Grondahl K, Grondahl HG. Limited cone-beam CT and intraoral radiography for the diagnosis of periapical pathology. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007;103:114-9.

17 Patel S, Dawood A, Ford TP, Whaites E. The potential applications of cone beam computed tomography in the management of endodontic problems. *Int Endod J* 2007;40:818-30.

- 18 Low KM, Dula K, Burgin W, von Arx T. Comparison of periapical radiography and limited cone-beam tomography in posterior maxillary teeth referred for apical surgery. *J Endod* 2008;34:557-62.
- 19 Kenneth MT, Low KM, Dula K, Burgin W, Arx T. Comparison of periapical radiography and limited cone-beam tomography in posterior maxillary teeth referred for apical surgery. *J Endod* 2008;34:557-62.
- 20 Cotti E. Advanced techniques for detecting lesions in bone. *Dent Clin North Am* 2010;54:215-35.
- 21 Fuhrmann R, Bucker A, Diedrich P. Radiological assessment of artificial bone defects in the floor of the maxillary sinus. *Dentomaxillofac Radiol* 1997;26:112-6.
- 22 Friedman S. Prognosis of initial endodontic therapy. *Endod Topics* 2002;2:59-88.
- 23 Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1986;8:307-10.
- 24 Hanneman S. Design, analysis, and interpretation of method comparison studies. *AACN Adv Crit Care* 2008;19:223-34.
- 25 Tanomaru JMG, Leonardo M, Tanomaru Filho M, Bonetti Filho I, Silva LAB. Effect of different irrigation solutions and calcium hydroxide on bacterial LPS. *Int Endod J* 2003;36:733-9.
- 26 De Rossi A, Silva LA, Leonardo MR, Rocha LB, Rossi MA. Effect of rotary or manual instrumentation, with or without a calcium hydroxide/1% chlorhexidine intracanal dressing, on the healing of experimentally induced chronic periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005;99:628-36.
- 27 Van der Vorst JR, van Dam RM, van Stiphout RS, van den Broek MA, Hollander IH, Kessels AG. Virtual liver resection and volumetric analysis of the future liver remnant using open source image processing software. *World J Surg* 2010;34:2426-33.
- 28 Moure SP, de Vargas KF, Borghetti RL, Salum FG, Cherubini K, da Silva VD, et al. Clinical and pathological characteristics of polymethylmethacrylate and hyaluronic acid in the rat tongue. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2012;10:1296-303.
- 29 Krouwer JS. Why Bland-Altman plots should use X, not $(Y+X)/2$ when X is a reference method. *Stat Med* 2008;27:778-80.
- 30 Vandenberghe B, Jacobs R, Yang J. Detection of periodontal bone loss using digital intraoral and cone beam computed tomography images: an in vitro assessment of bony and/or infrabony defects. *Dentomaxillofac Radiol* 2008;37:252-60.
- 31 Jorge EG, Tanomaru-Filho M, Goncalves M, Tanomaru JMG. Detection of periapical lesion development by conventional radiography or computed tomography. *Oral Surg*

Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2008;106:56–61.

32 Liang YH, Li G, Wesselink PR, Wu MK. Endodontic outcome predictors identified with periapical radiographs and cone-beam computed tomography scans. *J Endod* 2011;37:326–31.

33 Lennon S, Patel S, Foschi F, Wilson R, Davies J, Mannocci F. Diagnostic accuracy of limited volume cone beam computed tomography in the detection of periapical bone loss: 36 scans versus 180 scans. *Int Endod J* 2011;44:1118–27.

34 Robinson S, Suomalainen A, Kortensniemi M. Micro-CT. *Eur J Radiol* 2005;56:185–91.

35 Brealey S, Westwood M. Bias in plain film reading performance. *Br J Radiol* 2007;80:674–7.

36 Ng YL, Mann V, Rahbaran S, Lewsey J, Gulabivala K. Outcome of primary root canal treatment: systematic review of the literature – Part 1. Effects of study characteristics on probability of success. *Int Endod J* 2007;40:921–39.

List of Figures:

Figure 1 (A) PR image: the borders of AP were outlined using the freehand selections tool on ImageJ software for area measurement (B) CBCT major sagittal slice image: the borders of AP were outlined using the closed polygon tool on Osiri-X software for area measurement. (C) Measurement of AP's volume and its 3D reconstruction using Osiri-X 5.6 software.

Figure 2 Histological scores for apical inflammation: (A and D) score 1 - sparse mononuclear cells (hematoxylin and eosin, original magnification x40 and 100x, respectively), (B and E) score 2 - infiltrate of mononuclear cells and/or sparse neutrophils and eosinophils (hematoxylin and eosin, original magnification x40 and 100x, respectively), (C and F) score 3 - infiltrate of polymorphonuclear neutrophils or eosinophils (hematoxylin and eosin, original magnification x40 and 100x, respectively).

Figure 3 (A) Scatterplot between CBCT/PR APs area with agreement line (bold) and regression line. (B) Bland-Altman plot of PR/CBCT ratio by CBCT area showing the line of agreement (solid bold line at 1.00), mean ratio bias (solid line at 0.63) and 95% limits of agreement (dotted lines for lower and upper limits).

Figure 4 (A) Scatterplot between CBCT APs volume and PR APs area with agreement line (bold) and regression line. (B) Bland-Altman plot of PR/CBCT ratio by CBCT volume showing line of agreement (solid bold line at 1.00), mean ratio bias (solid lines at 0.53 for CBCT volume < 25mm³ and at 0.22 for CBCT volumes > 25mm³) and 95% limits of agreement (dotted lines for lower and upper limits, respectively).

Figure 1

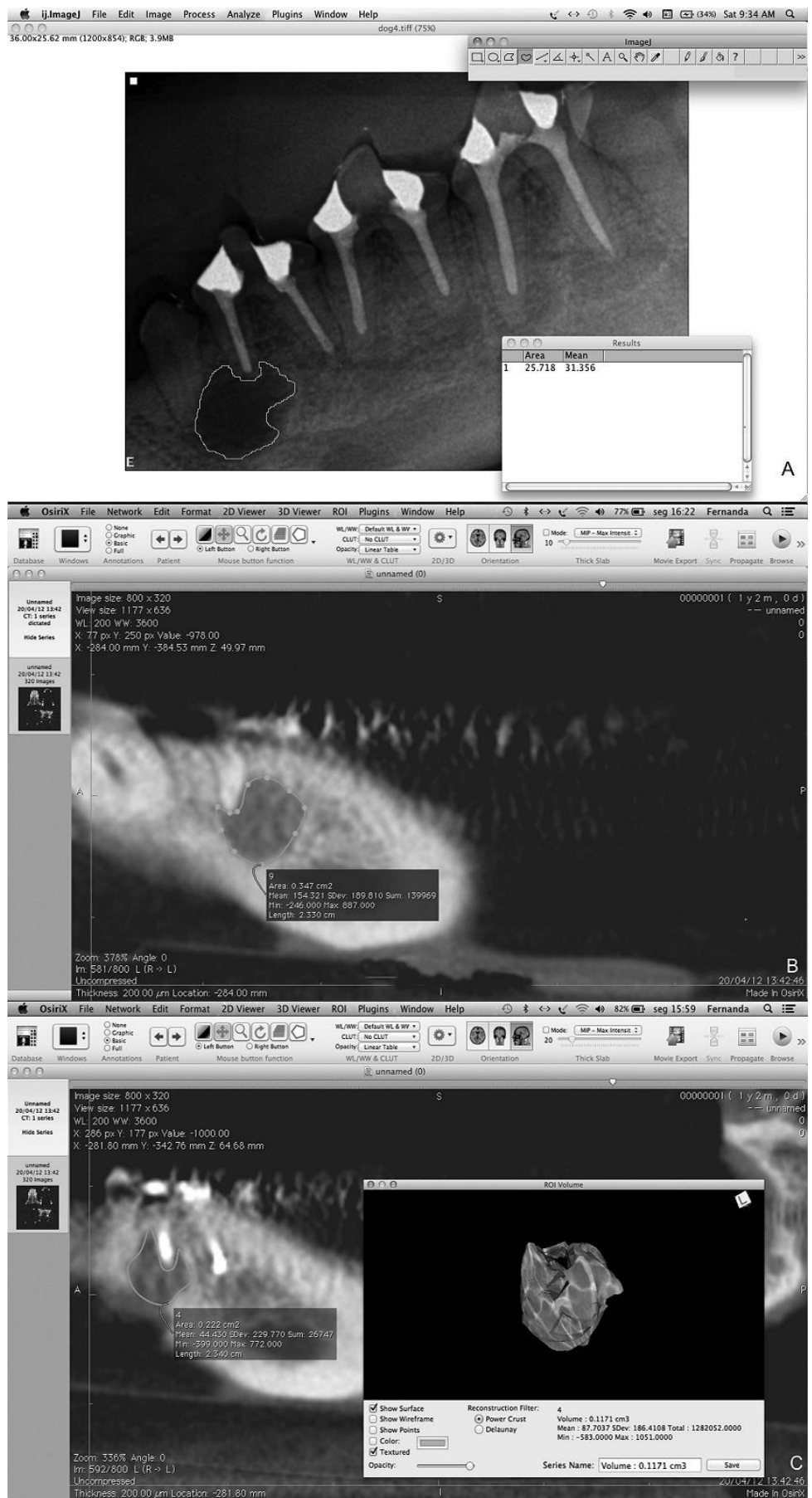


Figure 2

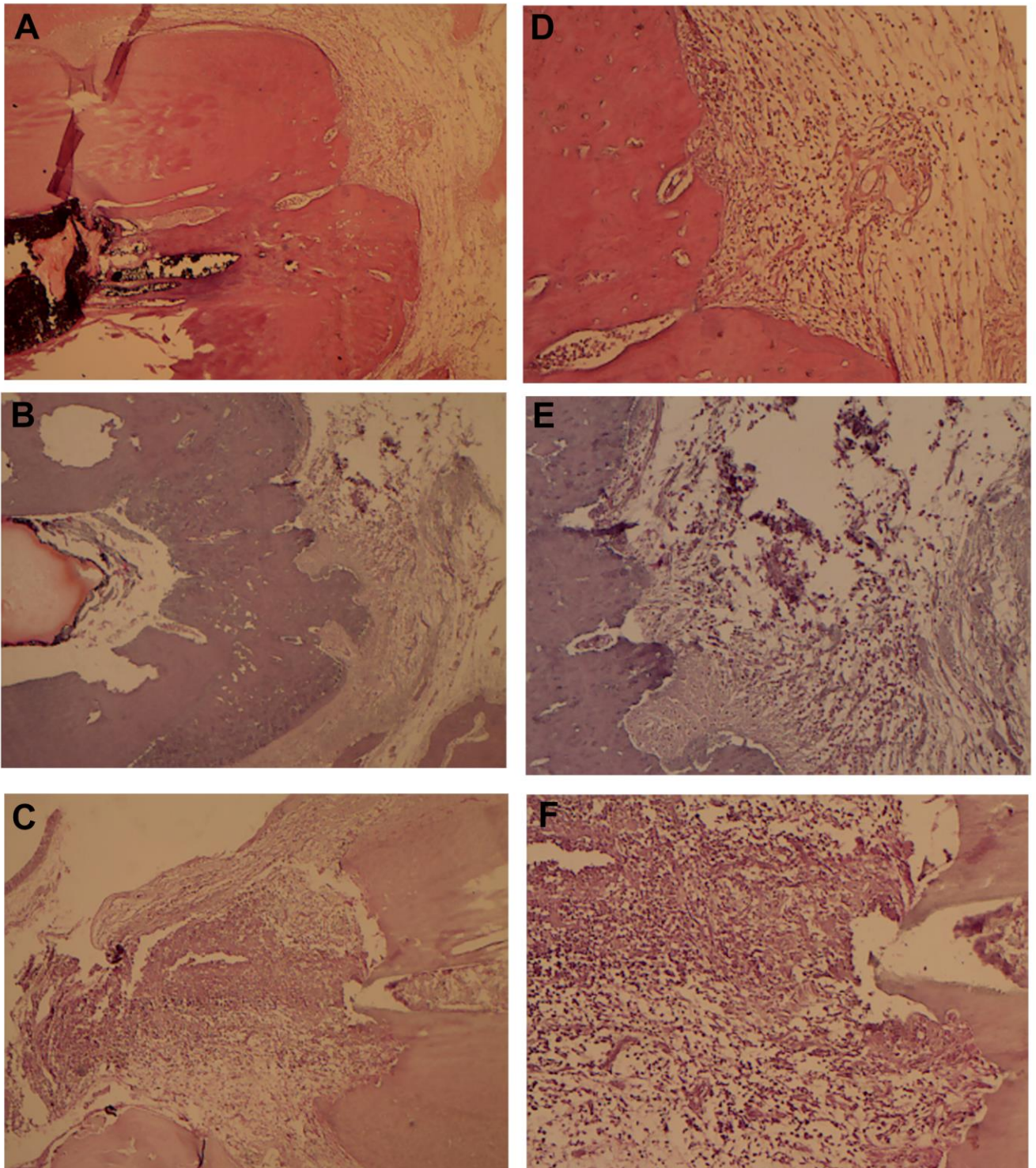


Figure 3

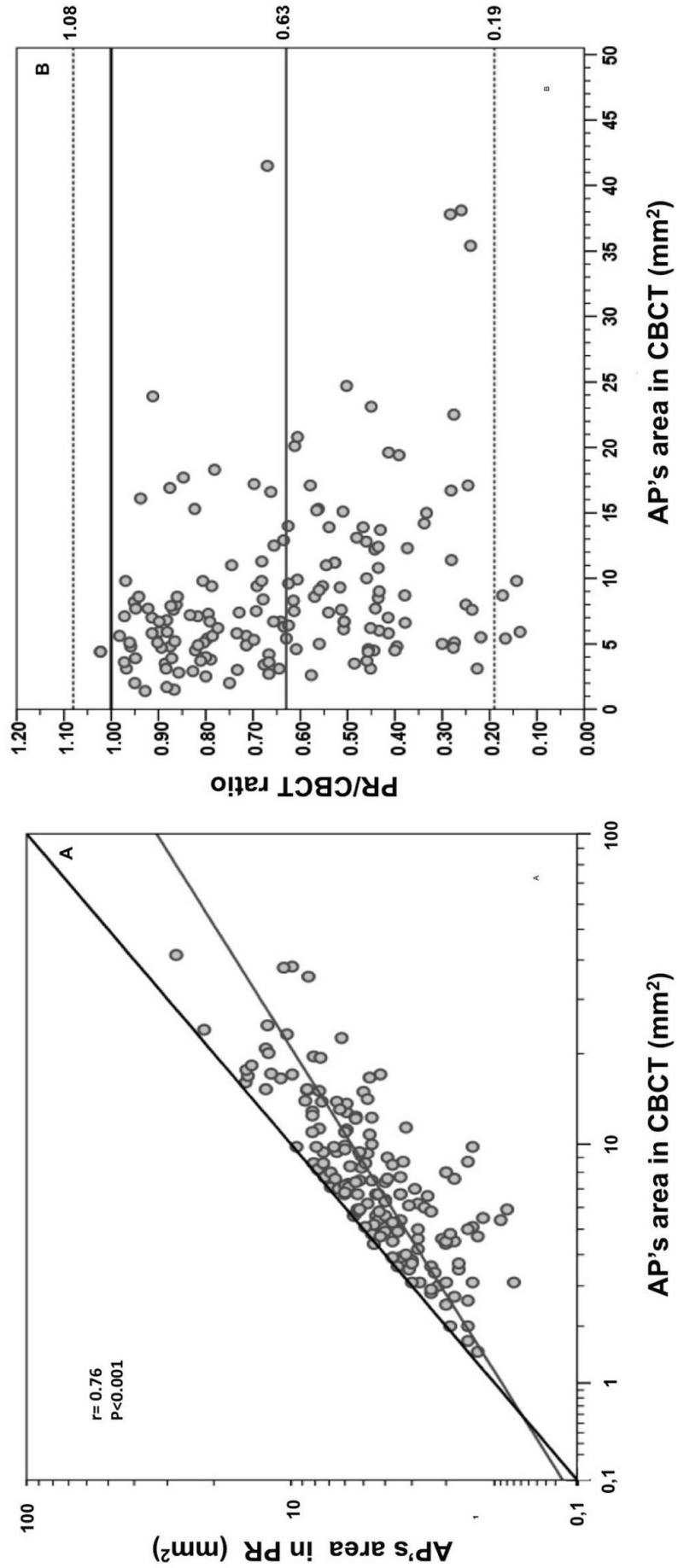


Figure 4

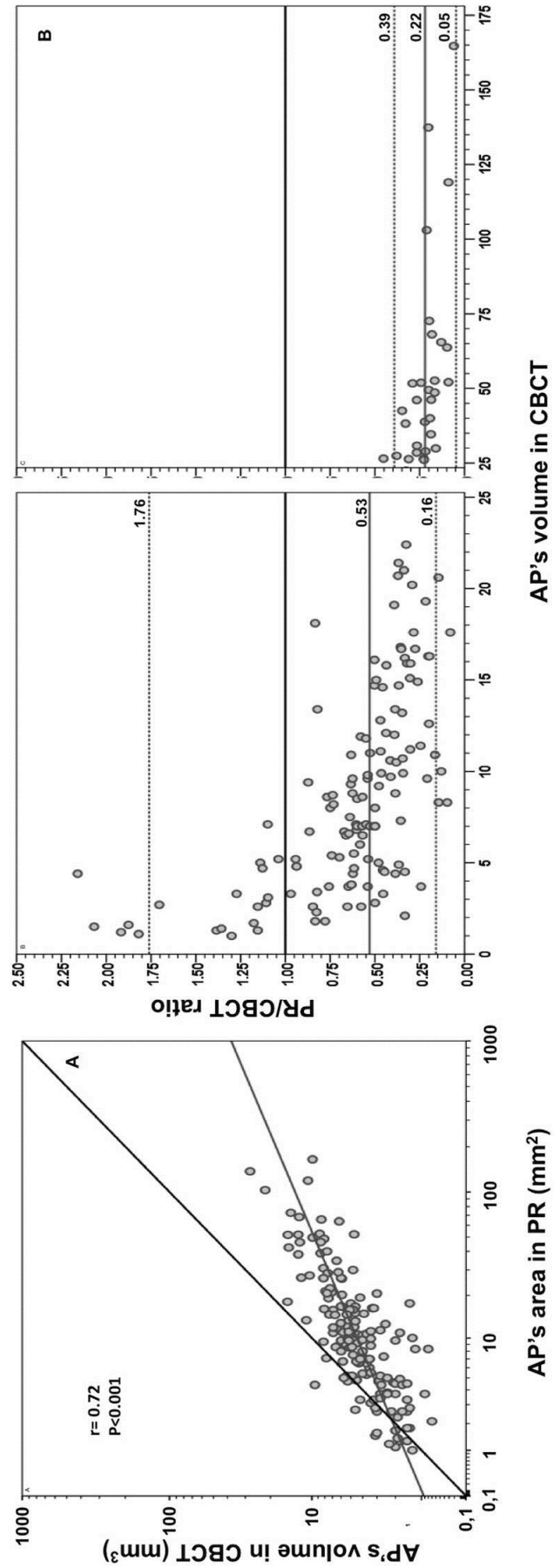


Table 1. Correlation between PR area, CBCT area, CBCT volume with the histological scores for inflammation.

	PR area (mm ²)		CBCT area (mm ²)		CBCT volume (mm ³)	
	r _s	P	r _s	P	r _s	P
histological scores	0.446	0.001**	0.461	0.001**	0.452	0.001**

** significant P≤0.01

5. Discussão

Os canais radiculares portadores de necrose pulpar associados a PA apresentam-se colonizados, predominantemente, por microrganismos anaeróbios especialmente os gram-negativos (SUNDQVIST, 1992; ASSED *et al.* 1996). O controle efetivo desse processo infeccioso é crítico para o sucesso da terapia endodôntica. Por isso, deve ser incessante a busca por protocolos efetivos de desinfecção do canal radicular, como o uso de soluções irrigadoras alternativas e uso da terapia fotodinâmica, em estudos *in vivo* que simulem o ambiente polimicrobiano de infecção do canal radicular.

A metodologia deste estudo *in vivo* buscou simular as condições clínicas existentes na terapia endodôntica. A contaminação polimicrobiana dos canais radiculares de dentes de cães, com a posterior indução de PAs teve a intenção de criar as mesmas peculiaridades e dificuldades encontradas neste tipo de tratamento, quando efetuado em humanos. Muitos trabalhos realizaram investigações sobre a eficácia de irrigantes ou medicações intracanaís utilizando monoinfecções, especialmente de *E. faecalis* (RETAMOZO, SHABAHANG & JOHNSON, 2010; GARCIA *et al.*, 2010; SOARES *et al.*, 2010). Contudo, esta não constitui a rotina enfrentada na terapia endodôntica.

Em um estudo de Ricucci & Siqueira (2010), os autores encontraram a presença de biofilmes na grande maioria dos casos de infecções endodônticas primárias (80%) e secundárias (74%), em dentes humanos extraídos portadores de PAs. Tempo suficiente e condições de adaptação ao meio são necessários para a formação de biofilmes maduros e organizados, assim como para a formação de PA radiograficamente visível. Nesse estudo, após ficarem abertos por duas semanas para contaminação, os canais

radiculares foram selados por dois meses para a indução de PA, que foi posteriormente confirmada radiograficamente. Na literatura, poucos são os trabalhos nos quais aguardaram-se períodos mais longos para o desenvolvimento e organização microbiana em biofilmes (GARCIA et al. 2010; ROSSI-FEDELE *et al.*, 2010; SOUZA *et al.*, 2010).

A penetração microbiana ao longo dos túbulos dentinários, ramificações e istmus é outro fator a ser considerado. Weiger *et al.* (2002) demonstraram, *in vitro*, que o tempo necessário para que ocorra uma penetração bacteriana numa profundidade de pelo menos 150 μm nos túbulos dentinários é de quatro semanas. De acordo com Siqueira (2005), a porção apical do canal deve ser considerada como um território crítico pela posição estratégica das bactérias.

A microbiota endodôntica e seus subprodutos são responsáveis por mudanças teciduais na região periapical, evidenciadas pelo acúmulo de células e enzimas inflamatórias e por alterações bioquímicas e de pH (McCORMICK, WEINE & MAGIO, 1983; WANG & SASHENKO, 1993; AQRABAWI *et al.* 1993). Dessa forma, a resposta inflamatória celular do hospedeiro, o critério de avaliação utilizado neste estudo, representa uma interessante ferramenta para a avaliação dos efeitos das terapias aplicadas. A região periapical de cada canal foi analisada e classificada qualitativamente de acordo com escores. Este critério de avaliação foi adotado, pois as análises histológicas quantitativas podem apresentar erros espaciais e temporais no momento da coleta de dados (NAIR, 1997). A composição da população celular na região apical pode mudar de acordo com o equilíbrio entre microrganismos e fatores do hospedeiro. Além disso, não existe um padrão homogêneo na distribuição das células do infiltrado. Dessa forma, nesta pesquisa, a região apical da abertura do forame radicular foi avaliada como um todo.

O tratamento endodôntico em uma única consulta é desejável para se evitar a recontaminação e reinfecção dos canais radiculares. Dessa forma, protocolos de desinfecção mais efetivos capazes de reduzir o número de intervenções tem sido intensivamente pesquisados nos últimos anos (DOBSON & WILSON, 1992; GARCIA *et al.*, 2010; STOJICIC *et al.*, 2013).

O hipoclorito de sódio (NaOCl) é o irrigante mais amplamente utilizado na Endodontia. Estudos como os de Clegg *et al.* (2006), Berber *et al.* (2006), Oliveira *et al.* (2007) e Retamozo, Shabahang & Johnson (2010), que testaram diferentes concentrações do NaOCl em dentes contaminados, comprovaram a maior eficácia do NaOCl quando utilizado em concentrações igual ou superiores a 5%. Contudo, quanto mais concentrado, maiores são os seus efeitos adversos. Características como seu alto grau de toxicidade quando extravasado para a região apical (KOSKINEN, RAHKAMO, TUOMPO, 1981; GATOT *et al.*, 1991; KOULAOUZIDOU *et al.*, 1999), efeitos deletérios sobre os tecidos dentais (SIM *et al.*, 2001; WHITE *et al.*, 2002) e sobre os instrumentos utilizados no preparo dos canais radiculares (BERUTTI *et al.*, 2006) levaram à procura de métodos de desinfecção alternativos com menores riscos e desvantagens.

O capítulo 1 deste trabalho traz dados referentes à avaliação histológica da endodontia de canais de dentes de cães com necrose pulpar e portadores de PAs onde foram utilizadas as soluções irrigantes Sterilox 400ppm (SX), NaOCl 2% (N2) e NaOCl 5% (N5) associados ou não à terapia fotodinâmica (PAD).

A resposta celular ao Sterilox ainda não foi investigada *in vivo*. Este é o primeiro estudo a mostrar uma análise histopatológica da região periapical dos canais preparados e irrigados com essa solução.

A solução de Sterilox 200 ppm apresentou dados iniciais animadores quanto à sua ação antimicrobiana, capacidade de remoção de biofilmes e menor toxicidade, quando comparada ao NaOCl. Estudos como o de Solovyeva & Dummer (2000) apontaram o Sterilox, como um possível substituto ao NaOCl. Da mesma forma Hope *et al.* (2010) encontraram eficácia similar para o NaOCl 6% e o Sterilox 200 ppm na remoção de biofilmes de *E. faecalis*. Contudo, estudos posteriores demonstraram que as águas super-oxidadas não apresentaram capacidade de dissolução de matéria orgânica (SHETTY, *et al.*, 1999; ROSSI-FEDELE *et al.*, 2011; ROSSI-FEDELE *et al.*, 2013). Os altos níveis de conteúdo orgânico presentes nos canais radiculares, assim como na estrutura do biofilme, particularmente em sua matriz extracelular, extinguem competitivamente os oxidantes reativos das águas-oxidadas, responsáveis pela sua atividade antimicrobiana (THORN *et al.*, 2012). Dessa forma, a concentração usual de 200 ppm do Sterilox foi duplicada no presente estudo, buscando diminuir este efeito.

Os resultados demonstraram que os irrigantes H2, H5 e SX, utilizados isoladamente, mostraram-se mais eficazes que a solução salina (SS) e quando combinados à PAD todos foram equivalentes entre si. Dessa forma, o Sterilox pode ser considerado uma alternativa ao NaOCl na terapia endodôntica, pois não demonstrou diferenças estatisticamente significantes do NaOCl nas concentrações de 2% e 5%, nos escores para inflamação apical. Estes resultados estão de acordo com os encontrados por Hope *et al.* (2010).

O tempo de contato adequado e a concentração suficiente da solução são necessários para uma ação mais profunda no biofilme (DOBSON & WILSON, 1992; THORN *et al.*, 2012). A maioria dos estudos *in vitro* (ROSSI-FEDELE *et al.*, 2010, ROSSI-FEDELE *et al.*, 2011) sobre o efeito antimicrobiano do Sterilox não apresentam o tempo de contato e as condições clínicas em que a solução é normalmente utilizada.

Quando a solução irrigadora for avaliada conjuntamente com o PQM, provavelmente o seu efeito microbicida possa ser melhorado. O preparo mecânico dos canais radiculares auxilia na introdução do irrigante na parte mais apical do canal, na remoção do seu conteúdo orgânico e inorgânico e no rompimento da estrutura dos biofilmes, permitindo uma ação mais efetiva da solução. Parece que além da concentração mais elevada do Sterilox utilizada neste estudo, o seu emprego nas condições clínicas melhorou o seu desempenho. Os resultados do trabalho também sugerem que diferenças sobre a eficácia do irrigante podem ser encontradas quando ele for testado como adjunto PQM do que somente por irrigação ou contato. Rossi-Fedele *et al.* (2010) avaliaram o efeito antimicrobiano do SX 200 ppm e NaOCl 5% na irrigação isolada ou em combinação com o preparo químico-mecânico em canais de dentes bovinos contaminados com *E. faecalis*. Apenas o NaOCl 5% se mostrou efetivo. Os autores sugerem que, talvez em presença de uma carga microbiana reduzida, resultado do PQM, a irrigação com as águas super-oxidadas possa ter algum efeito clinicamente relevante.

A avaliação histopatológica mostrou que resposta inflamatória intensa, áreas de abscesso e reabsorção cementária foram mais frequentemente encontradas no grupo controle (SS), demonstrando a necessidade do emprego de irrigantes com propriedades antimicrobianas.

Os melhores resultados foram encontrados no grupo H5/PAD, que apresentou os menores escores para inflamação, porém sem diferença significativa para os outros irrigantes. Esses achados então de acordo com outras pesquisas (MARAIS & BROZEL, 1999; ROSSI-FEDELE *et al.*, 2011) que também confirmaram o elevado poder antimicrobiano do NaOCl concentrado. Estudos como os de Berber *et al.* (2006) e Retamozo *et al.* (2010) comprovaram a eficácia antimicrobiana do NaOCl na

concentração de 5,25% sobre microrganismos presentes no interior dos túbulos dentinários, fato que não se repetiu para concentrações menores da mesma solução.

O maior poder antibacteriano do NaOCl em altas concentrações sobre os anaeróbios gram-negativos, predominantes na infecção dos canais desse estudo, também foi demonstrado (NIKOLAUS, WAYMAN & ENCINAS, 1988; GEORGOPOULOU, KONTAKIOTIS & NAKOU 1994; YELSILSOY *et al.*, 1995). Este tipo de bactéria, além de possuir diferentes fatores de virulência, libera, durante sua multiplicação ou morte, as endotoxinas de sua parede celular, substâncias que acentuam e perpetuam o processo inflamatório periapical (SILVA *et al.*, 2004). Portanto, a terapia endodôntica de dentes portadores de PA devem, não somente eliminar os microrganismos, mas, também, inativar as endotoxinas. Pesquisas têm demonstrado a eficácia do NaOCl 5% sobre as endotoxinas (DWYER & TORABINEJAD, 1981; TANOMARU *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2004).

Um fato de grande importância que se pode observar neste estudo, é que os escores celulares encontrados para o grupo H5/PAD contradizem a idéia de agressividade do NaOCl 5%, quando utilizado corretamente no interior do canal radicular.

O efeito da PAD aplicada como um suplemento imediatamente após ao PQM, protocolo preferencialmente proposto na Endodontia (RIOS *et al.*, 2011), também foi avaliado. De acordo com Souza *et al.* (2010), a instrumentação e a irrigação modificam o meio do canal radicular e rompem a estrutura dos biofilmes, tornando a comunidade microbiana mais suscetível à ação da PAD. O seu efeito também é esperado em áreas onde os instrumentos e soluções irrigantes não penetram, complementando a desinfecção, com a eliminação de microrganismos residuais ao PQM.

Os resultados deste estudo mostraram que a PAD não promoveu efeitos adicionais nos grupos irrigados com NaOCl, SX ou SS. Estes resultados estão de acordo com os encontrados no estudo de Souza *et al.* (2010). Esses autores sugerem que estes achados podem ser devidos ao fato de que o efeito da PAD foi, provavelmente, restrito às mesmas áreas afetadas pelos irrigantes.

Recentemente, Silva *et al.* (2012) investigaram o efeito antimicrobiano da PAD *in vivo*. Os autores avaliaram a resposta histológica da região apical à ação da PAD isoladamente e após o PQM em canais radiculares de dentes de cães com PAs. No grupo onde a PAD foi utilizada com o preparo, foram encontrados os melhores resultados, onde a região apical se mostrou livre de células inflamatórias e com moderada neoangiogênese. A metodologia usada foi bastante similar a deste estudo, com exceção de algumas diferenças metodológicas que podem ter influenciado os resultados. No trabalho de Silva *et al.* (2012), a solução dispersante utilizada foi o cloreto de fenotiazina e o irrigante utilizado no PQM foi o NaOCl 2,5%. Outro fator a ser considerado, é que o preparo apical foi realizado com o calibre #55 na presente pesquisa. Talvez uma maior dilatação apical, utilizando concentrações mais elevadas da mesma solução irrigadora possam ser responsáveis pela falta de diferenças significantes para o uso da PAD no presente estudo.

Egan *et al.* (2000) demonstraram que a transmissão da luz da PAD, através dos tecidos dentários, parece ser boa, com mínima atenuação pela dentina, penetrando até 3 mm em profundidade. Bonsor *et al.* (2006) também demonstraram que o cloreto de tolônio possui boas propriedades de umectação. Entretanto, mesmo após o PQM, o corante pode não penetrar adequadamente nas irregularidades do canal, túbulos dentinários ou mesmo na estrutura dos biofilmes remanescente, nas áreas intocadas das paredes dentinárias. Como a ação da PAD é limitada às áreas atingidas pelo

corante, o seu efeito se torna limitado. Dessa forma, um protocolo da PAD a ser usado como um suplemento para a desinfecção do canal radicular após o seu preparo, ainda fica a ser estabelecido.

Quatro outros estudos *in vivo* (BONSOR *et al.*, 2006; GARCEZ *et al.*, 2008; PINHEIRO *et al.*, 2009) e um *ex vivo* (NG *et al.*, 2011) trazem o potencial da PAD como uma técnica adjunta na eliminação dos microrganismos residuais após o PQM. De acordo com Ng *et al.* (2011), a PAD, utilizando o cloreto de tolônio como corante, melhora significativamente o resultado da terapia convencional em dentes com polpas necróticas e representa um meio para eliminar os microrganismos remanescentes.

A falta de significância estatística entre os grupos com e sem PAD deste trabalho pode ter sido influenciada pelo tamanho da amostra que foi limitada devido às dificuldades de um estudo *in vivo*. Contudo, outro ponto a ser considerado é que muitos dos estudos que demonstraram que a PAD promoveu adequada desinfecção nos canais radiculares, quando aplicada isoladamente (GARCEZ *et al.*, 2008; MEIRE *et al.*, 2009; SCHLAFER *et al.*, 2010; BAGO *et al.*, 2013) ou em combinação com o PQM (GARCEZ *et al.*, 2008; SCHLAFER *et al.*, 2010; NG *et al.*, 2011) realizaram coletas microbianas com cones de papel ou por meio de aspiração do conteúdo do canal. Esses métodos apresentam limitações importantes, pelo fato de coletarem somente microrganismos plantônicos, não contabilizando as bactérias organizadas em biofilmes ou mesmo localizadas no interior dos túbulos dentinários.

Na presente pesquisa, como já foi mencionado, após permanecerem abertos ao meio oral por duas semanas, os canais permaneceram selados por dois meses. Muitos dos estudos que avaliaram a PAD não aguardaram esse tempo para o amadurecimento do biofilme microbiano no sistema de canais radiculares. Dessa forma, podemos supor

uma organização microbiana mais complexa, apresentando maiores dificuldades para sua erradicação.

Outro dado de grande importância a respeito da PAD, é que no presente estudo ela foi testada em canais de pré-molares de cães que, em sua maioria são amplos e retos, permitindo uma aplicação da ponteira emissora da luz até o terço apical. Nos dentes humanos, os canais raramente são retos, possuindo curvaturas muitas vezes em duas dimensões.

O sistema de canais radiculares portador de processo infeccioso contém bactérias, seus subprodutos, fluidos teciduais, matriz dentinária e remanescentes de tecido pulpar, que podem ser encontrados mesmo após o PQM. Já foi demonstrado que esses componentes reduzem ou inibem completamente a atividade antimicrobiana da clorexidina e do hidróxido de cálcio (PORTENIER *et al.*, 2002; GOMES *et al.*, 2003). A capacidade antimicrobiana do cloreto de tolônio foi demonstrada (SOUKOS *et al.*, 1998; SOUKOS *et al.* 2003). Características como baixo peso molecular, cargas catiônicas e ser hidrofílico permitem que ele ultrapasse a membrana bacteriana e participe do processo de fotossensibilização (SOUKOS *et al.*, 2006). Um estudo de Shrestha & Kishen (2012) mostrou que tanto o cloreto de tolônio, corante usado neste estudo, quanto a PAD, da mesma forma que o hidróxido de cálcio e a clorexidina, tem o seu efeito reduzido em função da atenuação por componentes do canal radicular. A presença de vários íons alteram a captação do corante pelas células bacterianas e interferem no mecanismo antimicrobiano da PAD.

De acordo com os resultados expostos, a PAD parece não ter efeitos clínicos relevantes. Talvez ajustes em seu protocolo deveriam ser testados como, por exemplo,

o emprego de ondas ultra-sônicas buscando melhorar a penetração do corante no sistema de canais e nos biofilmes.

O segundo capítulo deste estudo estabelece correlações e concordâncias entre os exames de imagem utilizados na endodontia, a radiografia periapical (PR) e a tomografia cone-beam (CBCT), correlacionando ao seu padrão-ouro histológico.

Por muitos anos, a ausência de radiolucidez apical em canais endodonticamente tratados foi usada como parâmetro para diagnóstico de sucesso da terapia. Assim como em paciente, este método de diagnóstico vem sendo usado, há muito tempo, em pesquisa científica.

No diagnóstico das PAs, a detecção do seu tamanho apresenta grande importância no momento da tomada de decisão sobre qual terapia aplicar ou mesmo no acompanhamento clínico de um tratamento. Mesmo que a histologia seja considerada o padrão ouro, ela não representa um método acurado para mensurar a área e, principalmente, o volume das PAs. Assim, os dados fornecidos pelos exames de imagem foram correlacionados aos achados histológicos, buscando mostrar a relação direta entre o tamanho da PAs e a intensidade do processo inflamatório, aumentando a confiabilidade dos dados.

Inicialmente os resultados deste estudo sugeriram forte correlação entre as medidas das áreas das PRs e das CBCTs ($r=0,76$), bem como entre as áreas das PRs e o volume das CBCTs ($r=0,72$) no diagnóstico das PAs. Diante disso, poderia se pensar que a PR poderia fornecer dados preditivos da CBCT. Porém, após análise das medidas pelo método de BA, uma considerável falta de concordância foi encontrada entre os exames, evidenciando uma ampla variabilidade dos dados e a baixa acurácia da PR.

Áreas maiores de PAs são detectadas na CBCT, em comparação com as áreas encontradas na PR. Este fato vem a comprovar a complexidade em delimitar a verdadeira extensão das imagens radiolúcidas na PR, apesar de apresentar uma melhor resolução e melhor detalhamento do osso trabecular (VANDENBERGHE, JACOBS & YANG, 2008). Tais resultados estão de acordo com estudos prévios (LOFTHAG-HANSEN *et al.*, 2007; LOW *et al.*, 2008; ESTRELA *et al.*, 2008; de PAULA-SILVA *et al.*, 2009).

Quando a concordância entre a área da PR e o volume da CBCT foi calculada, os resultados mostraram que quanto maior o volume da CBCT mais subestimado é o seu valor na PR. Portanto, os resultados deste estudo sugerem fortemente que a PR não representa um método acurado para predizer dados da CBCT no diagnóstico da PA.

Recentemente, um grande número de estudos tem reportado a superioridade da CBCT na detecção das PAs, quando comparada a PR (LOFTHAG-HANSEN *et al.*, 2007; ESTRELA *et al.*, 2008; VANDENBERGHE, JACOBS & YANG, 2008; JORGE *et al.*, 2008; PAULA-SILVA *et al.*, 2009; LIANG *et al.*, 2011; LENON *et al.*, 2011). Entretanto, poucos avaliaram a capacidade de cada exame em demonstrar o tamanho das lesões (PAULA-SILVA *et al.*, 2009; ORDINOLA-ZAPATTA *et al.*, 2011). Como o planejamento da terapia e seu prognóstico, baseiam-se mais na extensão da lesão do que na sua simples presença, da mesma forma que o acompanhamento pós-terapia, o acesso a estas informações deve ser considerado de grande importância.

Além disso, até hoje, estudos tem comparado a acurácia da PR e da CBCT por meio da comparação entre as médias das mensurações obtidas por esses dois métodos, na avaliação de diferentes terapias (ORDINOLA-ZAPATTA *et al.*, 2011) e não

avaliando diretamente os métodos. Dessa forma, o intervalo de confiança da concordância entre eles frequentemente não é mostrado. Assim, a variabilidade dos dados e, conseqüentemente, a acurácia dos métodos não pode ser vista. Resultados baseados em valores médios podem conduzir a informações inconsistentes e não confiáveis.

A concordância entre a PR e a CBCT foi avaliada utilizando o modelo de efeitos aleatórios aplicado por meio do método de BA (BLAND & ALTMAN, 1986). Tal método permite comparações entre duas técnicas quando há mais de uma medida por sujeito (cão). Médias (usadas porque o viés não foi constante) foram avaliadas em relação aos dados da CBCT, considerado o método referência (KROUVER, 2008). O método de BA fornece medidas confiáveis do comportamento e variabilidade dos dados. Mais importante do que os valores médios, o intervalo de confiança de 95%, mostra o intervalo dentro do qual espera-se que 95% das diferenças entre as medidas de dois métodos devem estar. Este método é muito útil para mostrar a relação entre valores médios e diferenças, bem como para demonstrar quaisquer desvios sistemáticos e identificar possíveis valores discrepantes.

Paula-Silva *et al.* (2009) and Ordinola-Zapata *et al.* (2011) compararam a área da PR com o volume da CBCT e encontraram que a PR forneceu dados não confiáveis tanto na detecção das PAs quanto em demonstrar sua real extensão. Além disso, Ordinola-Zapata *et al.* (2011) não encontraram uma distribuição normal dos dados na comparação entre a área fornecida pela PR e o volume da CBCT e também não encontraram correlações entre estes dois métodos, usando o mesmo teste estatístico (coeficiente de correlação de Pearson) do presente estudo.

Medidas tomográficas e, especialmente, medidas radiográficas oferecem certo

grau de imprecisão. Assim, erros inerentes às técnicas devem ser quantificados e contextualizados (SOGUR *et al.*, 2009; ORDINOLA-ZAPATA *et al.*, 2011; LIANG *et al.*, 2011; LENON *et al.*, 2011). A subjetividade das avaliações, que são altamente dependentes da acurácia do examinador, podem afetar os resultados (ORDINOLA-ZAPATA *et al.*, 2011). Objetivando minimizar o erro humano na interpretação radiográfica (ROBINSON, SUOMALAINEN & KORTESNIEMI, 2005; BREALEY & WESTWOOD, 2007), apenas um experiente e calibrado endodontista realizou todas as mensurações no presente estudo.

De acordo com dados recentes (PAULA-SILVA *et al.*, 2009; ORDINOLA-ZAPATTA *et al.*, 2011), os cortes sagitais da CBCT fornecem as medidas mais acuradas da maior área da PA, embora utilizando esta medida para avaliar a PA pode-se superestimar seu verdadeiro tamanho, desde que ela não considera dados tridimensionais (PAULA-SILVA *et al.*, 2009; ORDINOLA-ZAPATTA *et al.*, 2011). Portanto, no presente trabalho, a área das PAs na CBCT foi mensurada nos cortes sagitais.

Informações sobre as taxas de sucesso de terapias, materiais, químicos e medicações usados na Odontologia auxiliam os clínicos na tomada de decisão sobre o que aplicar na sua prática. Como a maior parte dos estudos publicados sobre o sucesso clínico de tratamentos está baseada em dados de exames radiográficos (NG *et al.*, 2007), nós devemos questionar sobre a real efetividade das abordagens e estratégias atuais. Os dados do capítulo 2 sugerem que o uso da PR como método de diagnóstico, especialmente em pesquisa científica, não é mais aceitável.

O emprego da CBCT ainda é limitado, não sendo considerado um exame de rotina na terapia endodôntica. A CBCT implica em custos adicionais e dose extra de

radiação para o paciente. Além disso a maior parte dos consultórios não possui tomógrafos. Não obstante, em se tornando mais rotineiro o uso da CBCT na Odontologia, possivelmente aparelhos de melhor qualidade com menores doses de radiação e menos onerosos aos pacientes serão desenvolvidos.

6. Conclusões

Dentro das condições experimentais deste estudo, de acordo com os resultados apresentados no capítulo 1, o emprego da PAD após o preparo químico-mecânico não apresentou relevância clínica no resultado do tratamento endodôntico de dentes com necrose pulpar associados a periodontites apicais. A solução de Sterilox 400 ppm pode ser considerada como uma alternativa ao NaOCl na terapia endodôntica.

Os dados apresentados no capítulo 2 deste estudo sugerem fortemente que a PR não representa um método confiável para predizer com acurácia os dados da CBCT no diagnóstico da AP. As informações contidas na PR são limitadas e não deveriam ser empregadas em investigações científicas.

7. Referências

ALTMAN, D.G.; BLAND, J.M. Measuring agreement in method comparison studies. **Stat Method Med Res**, v. 8, n. 2, p. 135-60, Jun 1999.

AQRABAWI, J.; SCHILDER, H.; TOSELLI, P.; FRANZBLAU, C. Biochemical and histochemical analysis of the enzyme arylsulfatase in human lesions of endodontic origin. **J Endod**, v. 19, n. 7, p. 335-8, Jul 1993.

ASSED, S.; ITO, I.Y.; LEONARDO, M.R.; SILVA, L.A.B.; LOPATIN, D. Anaerobic microorganisms in root canals of human teeth with chronic apical periodontitis detected by immunofluorescence. **Endod Dent Traumatol**, v. 12, n. 2, p. 66-9, Apr 1996.

BAGO, I.; PLECKO, V.; GABRIC, D.; PANDURIC, G.; SCHAUPERL, Z.; BARABA, A.; ANIC, I. Antimicrobial efficacy of a high-power diode laser, photo-activated disinfection, conventional and sonic activated irrigation during root canal treatment. **Int Endod J**, v. 46, n. 4, p. 339-47, Apr 2013.

BAHCALL, J.; HOWARD, P.; MISERENDINO, L.; WALIA, H. Preliminary investigation of the histological effects of laser in endodontic treatment on the periradicular tissues in dogs. **J Endod**, v. 18, n. 2, p. 47-51, Feb 1992.

BENDER, I.B.; SELTZER, S. Roentgenographic and direct observation of experimental lesions in bone: I. **J Am Dent Assoc**, v. 62, p.152-60, 1961.

BENDER, I.B. Factors influencing the radiographic appearance of bone lesions. **J Endod**, v. 8, n. 4, p. 161-70, Apr 1982.

BERBER, V.B.; GOMES, B.P.; SENA, N.T.; VIANNA, ME; FERRAZ, CC; ZAIA, AA; SOUSA-FILHO, FJ. Efficacy of various concentrations of NaOCl and instrumentation techniques in reducing *Enterococcus faecalis* within root canals and dentinal tubules. **Int Endod J**, v. 39, n. 1, p. 10-7, Jan 2006.

BERGMANS, L.; MOISIADIS, P.; HUYBRECHTS, B.; VAN MEERBEEK, B.; QUIRYNEN, M.; LAMBRECHTS, P. Effect of photo-activated disinfection on endodontic pathogens ex vivo. **Int Endod J**, v. 41, n.3, p. 227-239, Mar 2008.

BERTRAND, M.F.; PIZZARDINI, P.; MULLER, M.; MEDIONI, E.; ROCCA, J.P. The removal of the smear layer using the Quantec system. A study using the scanning electron microscope. **Int Endod J**, v. 32, n. 3, p. 217-24, May 1999.

BERUTTI, E.; MARINI, R. A scanning electron microscopic evaluation of the debridement capability of sodium hypochlorite at different temperatures. **J Endod**, v. 22, n. 9, p. 467-70, Sep 1996.

BERUTTI, E.; ANGELINI, E.; RIGOLONE, M.; MIGLIARETTI, G.; PASQUALINI, D. Influence of sodium hypochloride on fracture properties and corrosion of ProTaper Rotary instruments. **Int Endod J**, v. 39, n. 9, p. 693-9, Sep 2006

BLAND, J.M.; ALTMAN, D.G. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. **Lancet**, v. 8, n. 1, p. 307-10, Feb 1986.

BONSOR, S.J.; NICHOL, R.; REID, T.M.S.; PEARSON, G.J. An alternative regimen for root canal disinfection. **Br Dent J**, v. 201, n. 2, p. 101-5, Jul 2006.

BREALEY, S.; WESTWOOD, M. Are you reading what are you reading? The effect of who interprets medical images on estimates of diagnostic test accuracy in systematic reviews. **Br J Radiol**, v. 80, n. 956, p. 674-7, Aug 2007.

BRENNER, D.J.; HALL, E.J. Computed tomography—an increasing source of radiation exposure. **N Engl J Med**, v. 357, n. 22, p. 2277-84, Nov 2007.

BROWN, D.C.; MOORE, B.K.; BROWN, C.E.; NEWTON, C.W. An in vitro study of apical extrusion of sodium hypochlorite during endodontic canal preparation. **J Endod**, v. 21, n. 12, p. 587-91, Dec 1995.

BYSTROM, A.; HAPPONEN, R.P.; SJOGREN, U.; SUNDQVIST, G. Healing of periapical lesions of pulpless teeth after endodontic treatment with controlled asepsis. **Endod Dent Traumatol**, v. 3, n. 2, p. 58-63, Apr 1987.

CLEGG, M.S.; VERTUCCI, F.J.; WALKER, C.; BELANGER, M.; BRITTO, L.R. The effect of exposure to irrigant solutions on apical dentin biofilms in vitro. **J Endod**, v. 32, n. 5, p. 434-7, May 2006.

COTTI, E.; VARGIU, P.; DETTORI, C.; MALLARINI, G. Computerized tomography in the management and follow-up of extensive periapical lesion. **Endod Dent Traumatol**, v. 15, p. 186-9, 1999.

COTTI, E. Advanced techniques for detecting lesions in bone. **Dent Clin North Am**, v. 54, n. 2, p. 215-35, Apr 2010.

DEPRAET FJ, DE BRUYNE MA, DE MOOR RJ. The sealing ability of an epoxy resin root canal sealer after Nd:YAG laser irradiation of the root canal. **Int Endod J**, v. 38, n. 5, p. 302-9, May 2005.

DE ROSSI, A.; DE ROSSI, M.; ROCHA, L.B.; DA SILVA, L.A.; ROSSI, M.A. Morphometric analysis of experimentally induced periapical lesions: radiographic vs histopathological findings. **Dentomaxillofac Radiol**, v. 36, n. 4, p. 211-7, May 2007.

DOBSON, J.; WILSON, M. Sensitization of oral bacteria in biofilms to killing by light from a low-power laser. **Arch Oral Biol**, v. 37, n. 11, p. 883-7, Nov 1992.

DONLAN, R.M.; COSTERTON, J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clin Microbiol Rev**, v. 15, n. 2, p. 167-93, Apr 2002.

DWYER, T.G.; TORABINEJAD, M. Radiographic and histologic evaluation of the effect of endotoxin on the periapical tissues of the cat. **J Endod**, v. 7, n. 1, p. 31-5, Jan 1981.

EGAN, J.; COLLIS, J.; PEARSON, G.J.; WILLIAMS, J. Transmission of 636nm Diode laser light through dentine. Colorado, USA: *Transaction of SPIE*, 2000.

ESTRELA, C.; BUENO, M.R.; LELES, C.R.; AZEVEDO, B.; AZEVEDO, R. Accuracy of cone beam computed tomography and panoramic and periapical radiography for detection of apical periodontitis. **J Endod**, v. 34, n. 3, p. 273-9, Mar 2008.

FANG, YZ; YANG, S; WU G. Free radicals, antioxidants and nutrition. **Nutrition**, v. 18, n. 10, p. 872-9, Oct 2002.

FOLWACZNY, M.; MEHL, A.; JORDAN, C.; HICKEL, R. Antibacterial effects of pulsed Nd:YAG laser radiation at different energy settings in root canals. **J Endod**, v. 28, n. 1, p. 24-9, Jan 2002.

FRIEDMAN, S. Prognosis of initial endodontic therapy. **Endod Top**, v. 2, n. 1, p. 59-88, Jul 2002.

FUHRMANN, R.; BUCKER, A.; DIEDRICH, P. Radiological assessment of artificial bone defects in the floor of the maxillary sinus. **Dentomaxillofac Radiol**, v. 26, n. 2, v. 112- 6, Mar 1997.

FUKUZAKI, S. Mechanisms of actions of sodium hypochlorite in cleaning and disinfection processes. **Biocontrol Sci**, v. 11, n. 4, p. 147-57, Dec 2006.

GARCEZ, A.S.; NUNEZ, S.C.; HAMBLIN, M.R.; RIBEIRO, M.S. Antimicrobial effects of photodynamic therapy on patients with necrotic pulps and periapical lesion. **J Endod**, v. 34, n. 2, p. 138-42, Feb 2008.

GARCIA, F.; MURRAY, P.E.; GARCIA-GODOY, F.; NAMEROW, K.N. Effect of aquatine endodontic cleanser on smear layer removal in the root canals of ex vivo human teeth. **J Appl Oral Sci**, v. 18, n. 4, p. 403-8, Jul-Aug 2010.

GATOT, 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**, v. 17, n. 11, p. 573-4, Nov 1991.

GEORGOPOULOU, M.; KONTAKIOTIS, E.; NAKOU, M. Evaluation of the antimicrobial effectiveness of citric acid and sodium hypochlorite on the anaerobic flora of the infected root canal. **Int Endod J**, v. 27, n. 3, p. 139-43, May 1994.

GOMES, B.P.; SOUZA, S.F.; FERRAZ, C.C.; TEIXEIRA, F. B.; ZAIA, A.A.; VALDRIGHI, L.; SOUZA-FILHO, F.J. Effectiveness of 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis* in bovine root dentine in vitro. **Int Endod J**, v. 36, n. 4, p. 267-75, Apr 2003.

GRIGORATOS, D.; KNOWLES, J.; NG, Y.L.; GULABIVALA, K. Effect of exposing dentine to sodium hypochlorite and calcium hydroxide on its flexural strength and elastic modulus. **Int Endod J**, v. 34, n.2, p. 113-9, Mar 2001.

HANNEMAN, S. Design, analysis, and interpretation of method comparison studies. **Adv Crit Care**, v. 19, n. 2, p. 223-34, Apr-Jun 2008.

HELLINGWERF, K.J.; HOFF, W.D.; CRIELAARD, W. Photobiology of microorganisms: how photosensors catch a photon to initialize signalling. **Molec Microbiol**, v. 21, n. 4, p. 683-93, Aug 1996.

HOPE, C.K.; GARTON, G.S.; WANG, Q.; BURNSIDE, G.; FARRELLY, P.J. A direct comparison between extracted tooth and filter-membrane biofilm models of endodontic

irrigation using *Enterococcus faecalis*. **Arch Microbiol**, v. 192, n. 9, p. 775-81, Sep 2010.

HUUMONEN, S.; ØRSTAVIK, D. Radiological aspects of apical periodontitis. **Endod Top**, v. 1, n. 1, p. 3-25, 2002.

JORGE, E.G.; TANOMARU-FILHO, M.; GONCALVES, M.; TANOMARU, J.M.G. Detection of periapical lesion development by conventional radiography or computed tomography. **Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol, Oral Radiol Endod**, v. 106, n. 1, p. 56-61, Jul 2008.

KAKEHASHI, S.; STANLEY, H.R.; FITZGERALD, R.J. The effects of surgical exposure of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 20, p. 340-9, Sep 1965.

KENNETH, M.T.; LOW, K.M.; DULA, K.; BURGIN, W.; ARX, T. Comparison of periapical radiography and limited cone-beam tomography in posterior maxillary teeth referred for apical surgery. **J Endod**, v. 34, n. 5, p. 557-62, May 2008.

KOSKINEN, K.P.; RAHKAMO, A.; TUOMPO, H. Cytotoxicity of some solutions used for root canal treatment assessed with human fibroblasts and lymphoblasts. **Scand J Dent Res**, v. 89, n. 1, p. 71-8, Feb 1981.

KOULAOUZIDOU, E.A.; MARGELOS, J.; BELTES, P.; KORTSARIS, A.H. Cytotoxic effects of different concentrations of neutral and alkaline EDTA solutions used as root canal irrigants. **J Endod**, v. 25, n. 1, p. 21-3, Jan 1999.

KROUWER, J.S. Why Bland-Altman plots should use X, not $(Y+X)/2$ when X is a reference method. **Stat Med**, v. 27, n. 8, p. 778-80, Feb 2008.

LENNON, S.; PATEL, S.; FOSCHI, F.; WILSON, R.; DAVIES, J.; MANNOCCI, F. Diagnostic accuracy of limited volume cone beam computed tomography in the detection of periapical bone loss: 36 scans versus 180 scans. **Int Endod J**, v. 44, n. 12, p. 1118-27, Dec 2011.

LEONARDO, M.R.; ROSSI, M.A.; SILVA, L.A.B.; ITO, I.Y.; BONIFACIO, K.C. Evaluation of bacterial biofilm and microorganisms on the apical external root surface of human teeth. **J Endod**, v. 28, n. 12, p. 815-8, Dec 2002.

LIANG, Y.H.; LI, G.; WESSELINK, P.R.; WU, M.K. Endodontic outcome predictors identified with periapical radiographs and cone-beam computed tomography scans. **J Endod**, v. 37, n. 3, p. 326-31, Mar 2011.

LOFTHAG-HANSEN, S.; HUUMONEN, S.; GRONDAHL, K.; GRONDAHL, H.G. Limited cone-beam CT and intraoral radiography for the diagnosis of periapical pathology. **Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol, Oral Radiol Endod**, v. 103, n. 1, p. 114-9, Jan 2007.

LOW, K.M.; DULA, K.; BURGIN, W.; VON ARX, T. Comparison of periapical radiography and limited cone-beam tomography in posterior maxillary teeth referred for apical surgery. **J Endod**, v. 34, n. 5, p. 557-62, May 2008.

MARAIS, J.T.; BRÖZEL, V.S. Electro-chemically activated water in dental unit water lines. **Br Dent J**, v. 187, n. 3, p.154-8, Aug 1999.

MARTIN, M.V.; GALLAGHER, M.A. An investigation of the efficacy of super-oxidised (Optident/Sterilox) water for the disinfection of dental unit water lines. **Br Dent J**, v. 198, n. 6, p. 353-4, Mar 2005.

MCCORMICK, J.E.; WEINE, F.S.; MAGGIO, J.D. Tissue pH of development periapical lesions in dogs. **J Endod**, v. 9, n. 2, p. 47-51, Feb 1983.

MEIRE, M.A.; DE PRIJCK, K.; COENYE, T.; NELIS, H.J.; DE MOOR, R.J.G. Effectiveness of different laser systems to kill *Enterococcus faecalis* in aqueous suspension and in an infected tooth model. **Int Endod J**, v. 42, n. 4, p. 351-9, Apr 2009.

MOLANDER, A.; REIT, C.; DAHLEN, G.; KVIST, T. Microbiological status off root-filled teeth with apical periodontitis. **Int Endod J**, v. 31, n. 1, p. 1-7, Jan 1998.

MOREIRA, DM; ALMEIDA, JF; FERRAZ, CC; GOMES, BP; LINE, SR; ZAIA, AA. Structural analysis of bovine root dentin after use of different endodontics auxiliary chemical substances. **J Endod**, v. 35, n. 7, p. 1023-7, Jul 2009.

MORITZ, A.; SCHOOP, U.; GOHARKHAY, K.; JAKOLITSCH, S.; KLUGER, W.; WERNISCH, J.; SPERR, W. The bactericidal effect of Nd:YAG, Ho:YAG, and Er:YAG laser irradiation in the root canal: an in vitro comparison. **J Clin Laser Med Surg**, v. 17, n. 4, p. 161-4, 1999.

MURMULLA, R.; WORTCHE, R.; MUHLING, J.; HASSFELD, S. Geometric accuracy of the NewTom 9000 Cone Beam CT. **Dentomaxillof Radiol**, v. 34, n. 1, p. 28-31, Jan 2005.

NAIR, P.N.R.; SJOGREN, U.; KREY, G.; KAHNBERG, K.E.; SUNDQVIST, G. Intraradicular bacteria and fungi in root-filled, asymptomatic human teeth with therapyresistant periapical lesions: a long-term light and electron microscopic follow-up study. **J Endod**, v. 16, n. 12, p. 580-8, Dec 1990.

NAIR, P.N.R. Apical periodontitis: a dynamic encounter between root canal infection and host response. **Periodontol**, v. 13, p. 121-48, Feb 1997.

NAIR, P.N.R.; HENRY, S.; CANO, V.; VERA, J. Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after one-visit' endodontic treatment. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 99, n. 2, p. 231-52, Feb 2005.

NAKATA, K.; NAITOH, M.; IZUMI, M.; INAMOTO, K.; ARIJI, E.; NAKAMURA, H. Effectiveness of dental computed tomography in diagnostic imaging of periradicular lesion of each root of a multirooted tooth: a case report. **J Endod**, v. 32, n. 6, p. 583-7, Jun 2006.

NG, Y.L.; MANN, V.; RAHBARAN, S.; LEWSEY, J.; GULABIVALA, K. Outcome of primary root canal treatment: systematic review of the literature – Part 1. Effects of study characteristics on probability of success. **Int Endod J**, v. 40, n. 12, p. 921-39, Oct 2007.

NG, R.; SINGH, F.; PAPAMANOU, D.A.; SONG, X.; PATEL, C.; HOLEWA, C.; PATEL, N.; KLEPAC-CERAJ, V.; FONTANA, C.; KENT, R.; PAGONIS, T.C.; STASHENKO, P.P.; SOUKOS, N.S. Endodontic Photodynamic Therapy Ex Vivo. **J Endod**, v. 37, n. 2,

p. 217-22, Feb 2011.

NIKOLAUS, B.E.; WAYMAN, B.E.; ENCINAS, E. The bactericidal effect of citric acid and sodium hypochlorite on anaerobic bacteria. **J Endod**, v. 14, n. 1, p. 31-4, Jan 1988.

ODOR, T.M.; WATSON, T.F.; PITT FORD, T.R.; MCDONALD, F. Pattern of transmission of laser light in teeth. **Int Endod J**, v. 29, n. 4, p. 228-34, Jul 1996.

OLIVEIRA, D.P.; BARBIZAM, J.V.B.; TROPE, M.; TEIXEIRA, F.B. In vitro antibacterial efficacy of endodontic irrigants against *Enterococcus faecalis*. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 103, n. 5, p. 702-6, May 2007.

ORDINOLA-ZAPATTA, R.; BRAMANTE, C.M.; DUARTE, M.H.; FERNANDES, L.M.P.S.R.; CAMARGO, E.J.; MORAES, I.G.; BERNARDINELLI, N.; VIVAN, R.R.; CAPELOZZA, A.L.A.; GARCIA, R.B. The influence of cone-beam computed tomography and periapical radiographic evaluation on the assessment of periapical bone destruction in dog's teeth. **Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol, Oral Radiol Endod**, v. 112, n. 2, p. 272-9, Aug 2011.

ORSTAVIK, D.; KEREKES, K.; ERIKSEN, H.M. The periapical index: scoring system for radiographic assessment of apical periodontitis. **Endod Dent Traumatol**, v. 2, n. 1, p. 20-34, Feb 1986.

PATEL, S.; DAWOOD, A.; FORD, T.P.; WHAITES, E. The potential applications of cone beam computed tomography in the management of endodontic problems. **Int Endod J**, v. 40, n. 10, p. 818-30, Oct 2007.

PATEL, S.; DAWOOD, A.; WHAITES, E.; PITT FORD, T. New dimensions in endodontic imaging: Part 1. Conventional and alternative radiographic systems. **Int Endod J**, v. 42, n. 6, p. 447-62, Jun 2009.

PAULA-SILVA FWG, HASSAN B, SILVA LAB, LEONARDO MR, WU M. Outcome of root canal treatment in dogs determined by periapical radiography and cone-beam computed tomography scans. **J Endod**, v. 35, n. 5, p. 723-6, May 2009.

PICCOLOMINI, R.; D'ARCANGELO, C.; D'ERCOLE, S.; CATAMO, G.; SCHIAFFINO, G.; DE FAZIO, P. Bacteriologic evaluation of the effect of Nd:YAG laser irradiation in experimental infected root canals. **J Endod**, v. 28, n. 4, p. 276-8, Apr 2002.

PINHEIRO, S.L.; SCHENKA, A.A.; NETO, A.A.; DE SOUZA, C.P.; RODRIGUEZ, H.M.; RIBEIRO, M.C. Photodynamic therapy in endodontic treatment of deciduous teeth. **Lasers Med Sci**, v. 24, n. 4, p. 521-6, Jul 2009.

PORTENIER, I.; HAAPASALO, H.; ORSTAVIK, D.; YAMAUCHI, M.; HAAPASALO, M. Inactivation of the antibacterial activity of iodine potassium iodide and chlorhexidine digluconate against *Enterococcus faecalis* by dentin, dentin matrix, type-I collagen, and heat-killed microbial whole cells. **J Endod**, v. 28, n. 9, p. 634-7, Sep 2002.

QUALTROUGH, A.J.E.; WHITWORTH, J.M.; DUMMER, P.M.H. Preclinical endodontology: an international comparison. **Int Endod J**, v. 32, n. 5, p. 406-14, Sep 1999.

RETAMOZO, B.; SHABAHANG, S.; JOHNSON, N. Minimum contact time and

concentration of sodium hypochlorite required to eliminate *Enterococcus faecalis*. **J Endod**, v. 36, n. 3, p. 520-3, Mar 2010.

RICUCCI, D.; BERGENHOLTZ, G. Bacterial status in root-filled teeth exposed to the oral environment by loss of restoration and fracture or caries—a histobacteriological study of treated cases. **Int Endod J**, v. 36, n. 11, p. 787-802, Nov 2003.

RICUCCI, D.; SIQUEIRA, J.F. Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. **J Endod**, v. 36, n. 8, p. 1277-88, Aug 2010.

RIOS, A.; HE, J.; GLICKMAN, G.N.; SPEARS, R.; SCHNEIDERMAN, E.D.; HONEYMAN, A.L. Evaluation of Photodynamic Therapy Using a Light-emitting Diode Lamp against *Enterococcus faecalis* in Extracted Human Teeth. **J Endod**, v. 37, n. 6, p. 856-9, Jun 2011.

ROBINSON, S.; SUOMALAINEN, A.; KORTESNIEMI, M. Micro-CT. **Eur J Radiol**, v. 56, n. 2, p. 185-91, Nov 2005.

ROSSI-FEDELE, G.; FIGUEIREDO, J.A.P.; STEIER, L.; CANULLO, L.; STEIER, G.; ROBERTS, A.P. Evaluation of the antimicrobial effect of super-oxidized water (Sterilox®) and sodium hypochlorite against *Enterococcus faecalis* in a bovine root canal model. **J Appl Oral Sci**, v. 18, n. 5, p. 498-502, Sep-Oct 2010.

ROSSI-FEDELE, G.; GUASTALLI, A.R.; DOĞRAMACI, E.J.; STEIER, L.; DE FIGUEIREDO, J.A. Influence of pH changes on chlorine-containing endodontic irrigating solutions. **Int Endod J**, v. 44, n. 9, p. 792-9, Sep 2011.

ROSSI-FEDELE, G.; STEIER, L.; DOGRAMACI, E.J.; CANULLO, L.; STEIER, G.; DE FIGUEIREDO, J.A. Bovine pulp tissue dissolution ability of HealOzone®, Aquatine Alpha Electrolyte® and sodium hypochlorite. **Aust Endod J**, v. 39, n. 2, p. 57-61, Aug 2013.

SCHLAFER, S.; VAETH, M.; HØRSTED-BINDSLEV, P.; FRANDBSEN, E.V.G. Endodontic photoactivated disinfection using a conventional light source: an in vitro and ex vivo study. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 109, n. 4, p. 634-41, Apr 2010.

SHETTY, N.S.; SRINIVASAN, J.; HOLTON, J.; RIDGWAY, G.L. Evaluation of microbicidal activity of a new disinfectant: Sterilox 2500 against *Clostridium difficile* spores, *Helicobacter pylori*, vancomycin resistant *Enterococcus* species, *Candida albicans* and several *Mycobacterium* species. **J Hosp Infect**, v. 41, n. 2, p. 101-5, Feb 1999.

SHRESTHA, A.; KISHEN, A. The effect of tissue inhibitors on the antibacterial activity of chitosan nanoparticles and photodynamic therapy. **J Endod**, v. 38, n. 9, p. 1275-8, Sep 2012.

SILVA, L.B.; LEONARDO, M.R.; ASSED, S.; TANOMARU FILHO, M. Histological study of the effect of some irrigating solutions on bacterial endotoxin in dogs. **Braz Dent J**, v. 15, n. 2, p. 109-14, 2004.

SILVA, L.A.B.; NOVAES, A.B.; OLIVEIRA, R.R.; NELSON-FILHO, P.; SANTAMARIA, M.; SILVA, R.A.B. Antimicrobial photodynamic therapy for the treatment of teeth with apical periodontitis: a histopathological evaluation. **J Endod**, v. 38, n. 3, p. 360-6, Mar 2012.

SIM, T.P.; KNOWLES, J.C.; NG, Y.L.; SHELTON, J.; GULABIVALA, K. Effect of sodium hypochlorite on mechanical properties of dentine and tooth surface strain. **Int Endod J**, v. 34, n. 2, p. 120-32, Mar 2001.

SIQUEIRA, J.F. Reaction of periradicular tissues to root canal treatment: benefits and drawbacks. **Endod Topics**, v. 10, p. 123-47, 2005.

SIQUEIRA, J.F.; ROÇAS, I.N. Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. **J Endod**, v. 34, n. 11, p. 1291-301, Nov 2008.

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, n. 5, p. 297-306, Sep 1997.

SOARES, J.A.; CARVALHO, M.A.R.; SANTOS, S.M.C.; MENDONÇA, R.M.C.; RIBEIRO-SOBRINHO, A.P.; BRITOJUNIOR, M.; MAGALHAES, P.P.; SANTOS, M.H.; FARIAS, L.M. Effectiveness of chemomechanical preparation with alternating use of sodium hypochlorite and EDTA in eliminating intracanal *Enterococcus faecalis* biofilm. **J Endod**, v. 36, n. 5, p. 894-8, May 2010.

SOGUR, E.; BAKSI, B.G.; GRONDAHL, H.G.; LOMCALI, G.; SEN, B.H. Detectability of chemically induced periapical lesions by limited cone beam tomography, intra-oral digital and conventional film radiography. **Dentomaxillofac Radiol**, v. 38, n. 7, p. 458-64, Oct 2009.

SOLOVYEVA, A.M.; DUMMER, P.M. Cleaning effectiveness of root canal irrigation with electrochemically activated anolyte and catholyte solutions: a pilot study. **Int Endod J**, v. 33, n. 6, p. 494-594, Nov 2000.

SOUKOS, N.S.; XIMENEX-FYVIE, L.A.; HAMBLIN, M.R.; SOCRANSKY, S.S.; HASAN, T. Targeted antimicrobial photochemotherapy. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 42, n. 10, p. 2595-601, Oct 1998.

SOUKOS, N.S.; MULHOLLAND, S.E.; SOCRANSKY, S.S.; DOUKAS, A.G. Photodestruction of human dental plaque bacteria: enhancement of the photodynamic effect by photomechanical waves in an oral biofilm model. **Las Surg Med**, v. 33, n. 3, p. 161- 8, 2003.

SOUKOS, N.S.; CHEN, P.S.; MORRIS, J.T. Photodynamic therapy for endodontic disinfection. **J Endod**, v. 32, n. 10, p. 979-84, Oct 2006.

SOUZA, L.C.; BRITO, P.R.R.; OLIVEIRA, J.C.M.; ALVES, F.R.F.; MOREIRA, E.J.L.; SAMPAIO-FILHO, H.R.; RÔÇAS, I.N.; SIQUEIRA, J.F. Photodynamic therapy with two different photosensitizers as a supplement to instrumentation/irrigation procedures in promoting intracanal reduction of *Enterococcus faecalis*. **J Endod**, v. 36, n. 2, p. 292-6, Feb 2010.

SPÅNGBERG, L.; ENGSTRÖM, B.; LANGELAND, K. Biological effect of dental materials. Toxicity and antimicrobial effects of endodontic antiseptics in vitro. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 36, n. 6, p. 856-71, Dec 1973.

STABHOLZ, A.; FRIEDMAN, S.; TAMSE, A. Endodontic failures and re-treatment. In: Cohen S & Burns RC, ed. **Pathways of the pulp**. 6. ed. St Louis: Mosby, 1994. p. 692-3.

STOJICIC, S.; AMORIM, H.; SHEN, Y.; HAAPASALO, M. Ex vivo killing of *Enterococcus faecalis* and mixed plaque bacteria in planktonic and biofilm culture by modified photoactivated disinfection. **Int Endod J**, v. 46, p. 649-659, Jul n. 7, 2013.

TANOMARU, J.M.; LEONARDO, M.R.; TANOMARU FILHO, M.; BONETTI FILHO, I.; SILVA, L.A. Effect of different irrigation solutions and calcium hydroxide on bacterial LPS. **Int Endod J**, v. 36, n. 11, p. 733-9, Nov 2003.

THORN, R.M.S.; LEE, S.W.H.; ROBINSON, G.M.; GREENMAN, J.; REYNOLDS, D.M. Electrochemically activated solutions: evidence for antimicrobial efficacy and applications in healthcare environments. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 31, n. 5, p. 641-53, May 2012.

TRONSTAD, L; BARNETT, F; CERVONE, F. Periapical bacterial plaque in teeth refractory to endodontic treatment. **Endod Dent Traumatol**, v. 6, n. 2, p. 73-7, Apr 1990.

TROPE, M.; PETTIGREW, J.P.; BARNETT, F.; TRONSTAD, L. Differentiation of radicular cyst and granulomas using computerized tomography. **Endod Dent Traumatol**, v. 5, n. 2, p. 69-72, Apr 1989.

TROPE, M; DELANO, EO; ORSTAVIK, D. Endodontic treatment of teeth with apical periodontitis: single vs. multivisit treatment. **J Endod**, v. 25, n. 5, p. 345-50, May, 1999.

VANDENBERGHE, B.; JACOBS, R.; YANG, J. Detection of periodontal bone loss using digital intraoral and cone beam computed tomography images: an in vitro assessment of bony and/or infrabony defects. **Dentomaxillofac Radiol**, v. 37, n. 5, p. 252-60, Jul 2008.

VAN DER STELT, P.F. Experimentally produced bone lesions. **Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol**, v. 59, n. 3, p. 306-12, Mar 1985.

VELVART, P.; HECKER, H.; TILLINGER, G. Detection of the apical lesion and the mandibular canal in conventional radiography and computed tomography. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 92, n. 6, p. 682-8, Dec 2001.

WANG, C.Y.; STASHENKO, P. Characterization of bone-resorbing activity in human periapical lesions. **J Endod**, v. 19, n. 3, p. 107-11, Mar 1993.

WEIGER, R.; DE LUCENA, J.; DECKER, H.E.; LOST, C. Vitality status of microorganisms in infected human root dentine. **Int Endod J**, v. 35, n. 2, p. 166-71, Feb 2002.

WHITE, J.D.; LACEFIELD, W.R.; CHAVERS, L.S.; ELEAZER, P.D. The effect of three

commonly used endodontic materials on the strength and hardness of root dentin. *J Endod*, v. 28, n. 12, p. 828-30, Dec 2002.

WU, M.K.; DUMMER, P.M.H.; WESSELINK, P.R. Consequences of and strategies to deal with residual post-treatment root canal infection. *Int Endod J*, v. 39, n. 5, p. 343-56, May 2006.

YESILSOY, C.; WHITAKER, E.; CLEVELAND, D.; PHILLIPS, E.; TROPE, M. Antimicrobial and toxic effects of established and potential root canal irrigants. *J Endod*, v. 21, n. 10, p. 513-5, Oct 1995.

8. Anexos

Anexo A: Parecer do CCEFO-PUCRS

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

Porto Alegre 06 de Janeiro de 2012

O Projeto de: Tese

Protocolado sob nº: 0010/11

Intitulado: Análise comparativa da eficácia do sterilox e do hipoclorito de sódio, associados ou não à terapia fotodinâmica, no tratamento de dentes de cães com lesão periapical

Pesquisador Responsável: Profa. Dra. Fabiana Vieira Vier Pelisser

Pesquisadores Associados: Fernanda Ullmann Lopez

Nível: Tese / Doutorado

Foi **aprovado** pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da PUCRS em *06 de Janeiro de 2012*.

Este projeto deverá ser imediatamente encaminhado ao CEUA/PUCRS

Profa. Dra. Ana Maria Spohr
Presidente da Comissão Científica e de Ética da
Faculdade de Odontologia da PUCRS

Anexo B: Parecer do CEUAFO-UPF

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
VICE-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

PARECER Nº 014/2011

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade de Passo Fundo, em reunião no dia 22/08/11, analisou o protocolo de pesquisa "AVALIAÇÃO DE PROCESSOS REGENERATIVOS, INFLAMATÓRIOS E DE REPARO EM TECIDOS PULPARES E PERIAPICAIS DE CÃES SUBMETIDOS A DIVERSOS PROCEDIMENTOS ENDODÔNTICOS", registro na CEUA Nº 009/2011, de responsabilidade do pesquisador **Álvaro Della Bona**.

O pesquisador e seus colaboradores estão comprometidos com a observância dos procedimentos para o uso científico de animais estabelecidos na Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008 e dos "*Princípios Éticos para o Uso de Animais de Laboratório*" preconizados pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL).

Diante do exposto, a Comissão, de acordo com suas atribuições definidas na Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa na forma como foi proposto.

O pesquisador deverá apresentar relatório à CEUA ao final do estudo.

Situação: PROTOCOLO APROVADO

Passo Fundo, 23 de agosto de 2011.

Prof. Ana Cristina Vendrametto V. Giacomini
Coordenadora - CEUA - UPF