

EFEITO DA TERAPIA ENDODÔNTICA COMPLEMENTAR EM BIOFILME NO SISTEMA DE CANAIS RADICULARES: LASERTERAPIA, MEDICAÇÃO INTRACANAL COM E SEM AGITAÇÃO SÔNICA – ESTUDO IN VITRO

Cláudia de Moura CARREIRA

CARREIRA, Cláudia de Moura. **Efeito da terapia endodôntica complementar em biofilme no sistema de canais radiculares: laserterapia, medicação intracanal com e sem agitação sônica – estudo in vitro.** Projeto de investigação científica, do Curso de Odontologia – Centro Universitário Fibra, Belém, 2022.

A endodontia, especialidade responsável pela prevenção e tratamento da periodontite apical, doença que se desenvolve nos tecidos periapicais com etiologia microbiana em forma de biofilme aderido no sistema de canais radiculares, pode causar comprometimento sistêmico e acometer metade da população adulta mundial. Por não conseguir esterilizar o sistema de canais, substâncias químicas são utilizadas concomitantemente para permitir melhor redução microbiana. Nos casos de infecção dos tecidos perirradiculares, indica-se a complementação de

medicações intracanal para que o efeito químico se estenda por mais tempo e se difunda para alcançar áreas não tocadas pelos instrumentos endodônticos. Após a etapa de medicação intracanal e, no momento da obturação, bactérias podem ser identificadas e, assim, ainda ocorrer o reparo dos tecidos apicais. Isso se dá devido à etapa de obturação do canal “sepultar” os microrganismos no interior do sistema de canais e impedir que o exsudato penetre pelo forame apical, dificultando a entrada de nutrientes para os microrganismos remanescentes. O problema decorre do fato de o valor numérico de cepas microbianas não ter sido quantificado e poder variar de um indivíduo para outro. O profissional deve usar de todos os coadjuvantes disponíveis para promover o melhor nível de desinfecção. Considerando o exposto, o estudo aqui realizado teve por objetivo avaliar o efeito da terapia endodôntica complementar sobre o biofilme maduro, no sistema de canais radiculares composto por *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*. Foi um estudo *in vitro*, desenvolvido no laboratório multidisciplinar e no laboratório de microbiologia do Centro Universitário Fibrá. Por envolver humanos, foi submetido ao Comitê de Ética dessa

instituição. Avaliaram-se o benefício da terapia fotodinâmica (TFD) após o preparo químico-mecânico; a ativação sônica sobre o fotossensibilizador (FS) na TFD; o efeito da medicação intracanal; o efeito da TFD associado à medicação intracanal; e a ativação sônica sobre a medicação intracanal. A TFD depende da administração do FS associado à irradiação com luz visível de comprimento de onda adequado. A absorção da luz desencadeia a excitação do FS, que, na presença do oxigênio encontrado nas células-alvo, leva a uma cascata de efeitos fotoquímicos via transferência de elétrons (reação tipo I) ou transferência de energia (reação tipo II), resultando na produção de espécies altamente reativas de oxigênio como os superóxidos e oxigênio singleto. As amostras foram compostas de raízes de 60 dentes anteriores (incisivos inferiores), permanentes, recém-extraídos por razões de doença periodontal ou pulpares, de pacientes da clínica integrada do Centro Universitário Fibrá, os quais foram orientados sobre o estudo e a necessidade de assinatura do termo de consentimento livre esclarecido (TCLE). Radiografias periapicais foram realizadas nos sentidos méso-distal e vestibulo-lingual, para seleção de

dentos com canal único, com auxílio de sensor digital CDR Elite digital (Schick Technologies). Foram excluídos da amostra experimental os dentes com rizogênese incompleta, reabsorções internas e externas, linhas de fraturas, raízes curvas (ou dilaceradas) e canais radiculares preparados e/ou obturados. Os dentes foram imersos e mantidos por 48h, em hipoclorito de sódio a 1%, com intuito de promover um controle microbiano. Os remanescentes orgânicos foram removidos das superfícies radiculares com curetas periodontais do tipo Gracey (SSWhite, Duflex, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Após esse período, foram armazenados e mantidos em solução fisiológica, sob refrigeração a 4°C, até o início do preparo das amostras. Os dentes tiveram suas coroas seccionadas horizontalmente com auxílio de discos diamantados de dupla face (KG Sorensen, São Paulo, SP, Brasil), sob irrigação abundante, a fim de padronizar o comprimento radicular em 17 mm. O comprimento de trabalho foi determinado subtraindo 1mm dessa medida (16 mm). O acesso do canal foi realizado com broca diamantada esférica (KG Sorensen, São Paulo, SP, Brasil) 1012 HL, sendo realizada a exploração com lima K #10 até a obtenção da patência de 1 mm além do

forame. Para padronização do diâmetro inicial do canal, foi realizado o preparo químico-mecânico com instrumentos rotatórios 15.05, 25.05, 35.05 (Logic, Easy Equipamentos Odontológicos, Brasil), em toda a extensão do comprimento de trabalho, com auxílio do motor endodôntico (Motor BassiiRoot, Easy Equipamentos Odontológicos, Brasil). A cada troca da lima, foi feita irrigação com 2 ml de solução de hipoclorito de sódio a 2,5% (ASFER Indústria Química, Brasil). Os ápices dos dentes foram selados com resina fotopolimerizável (Z100, 3M, Sumaré, SP, Brasil) para que não ocorresse contaminação da amostra e as superfícies externas das raízes foram impermeabilizadas com camada de adesivo epóxi (Araldite - Bascola, São Paulo, Brasil), exceto na região cervical da raiz. Todos os dentes foram fixados em microtubos tipo eppendorff com resina acrílica quimicamente ativada (Dencor®, Brasil) e colocados em estantes para microtubos. As amostras e o material utilizado foram esterilizados em autoclave, após a preparação para descontaminação (20 min a 121°C). Suspensões microbianas padronizadas foram obtidas na concentração 1 da escala de McFarland para *E. coli*, *E. faecalis* e na concentração 2 para *C.*

albicans. Com o auxílio de um espectrofotômetro, os parâmetros de densidade óptica e comprimento de onda utilizados foram, respectivamente: 0,324 e 590 nm para *E. coli*, 0,298 e 760 nm para *E. faecalis*, 0,284 e 530 nm para *C. albicans*. Os canais radiculares foram preenchidos, com auxílio de micropipeta automática, com 10 µL de suspensão de *E. coli* (ATCC), seguida da adição de 10 µL de caldo de cultura (BHI). Decorridos sete dias, foram acrescentados nos canais 5 µL de suspensão de *C. albicans* (ATCC), 5 µL *E. faecalis* (ATCC) e mais 10 µL de caldo BHI. O selamento cervical foi realizado com uma bolinha de algodão esterilizada, embebida em caldo BHI, e as placas foram incubadas, em estufa de a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$, sob umidade relativa, totalizando 28 dias de contaminação. Durante esse período, foram acrescentados 20 µL de caldo de cultura (BHI) no interior do canal, três vezes por semana, em dias intercalados. De acordo com a terapia complementar, os espécimes foram divididos em 4 grupos experimentais e o grupo controle (n=12): G1) aplicação da terapia fotodinâmica; G2) aplicação da TFP, sendo o FS ativado com easyclean por 1 min; G3) aplicação do hidróxido de cálcio por 14 dias; e G4) aplicação do hidróxido de cálcio agitado por 1 min. Para o grupo

controle, os espécimes receberam apenas o protocolo de irrigação final e não receberam qualquer terapia coadjuvante, permanecendo, assim, os canais com solução salina. Após 28 dias de contaminação, foi realizada a 1ª coleta (coleta de confirmação), onde foi avaliado se houve proliferação dos microrganismos contaminados. Após isso, com o auxílio de uma seringa de 5 ml e agulha 0,55 X 20 esterilizadas, todas as amostras foram submetidas ao protocolo de irrigação final, composto por 3 ciclos de agitação com Easy Clean, sendo 2ml do NaOCl 2,5% por 20 seg a cada ciclo e 0,3 ml do EDTA (Biodinâmica, Brasil) por 20 seg a cada ciclo, totalizando 18 mL de NaOCl e 0,9 mL de EDTA. Os dois grupos experimentais com a laserterapia foram expostos com a solução de azul de metileno 0,005% como fotossensibilizante (Fórmula e Ação, SP, Brasil), com período pré-irradiação de 5 min, tendo a diferença no grupo 2, ao realizar agitação do AM com Easy Clean no canal radicular por 1 min. Posteriormente, a fibra foi inserida no canal radicular, sendo utilizado o laser de baixa potência do tipo diodo (Therapy XT, DMC Equipamentos Ltda, São Carlos, SP, Brasil), emitindo luz vermelha no comprimento de onda (λ) de 660 nm e

operando em modo de onda contínua (CW) (potência de 100 mW, energia de 9J, e spot tamanho de 0,028 cm²). A irradiação foi realizada por 90 segundos, tendo a fibra movida dentro do canal radicular em movimentos helicoidais apical-cervicais. Após a aplicação das terapias coadjuvantes, foi realizada a 2^a coleta. A seguir, foi adicionada bolinha de algodão embebida em solução salina nos canais radiculares e as amostras foram incubadas por sete dias na estufa para posteriormente ser realizada a 3^a coleta (coleta tardia). Foram realizadas três coletas do conteúdo dos canais radiculares. A 1^a., após o período de 28 dias de formação do biofilme; a 2^a., imediatamente após a aplicação da terapia proposta; e a 3^a., após sete dias. Durante esse tempo, as placas permaneceram fechadas em estufa a 37°C, em ambiente úmido. Para a realização das coletas, foram adicionados 3 cones de papel absorvente esterilizados (Allprime, produtos odontológicos, Brasil) calibre #35 consecutivamente no interior do canal radicular, de forma a tocar todas as paredes, mantidos por 1 min. Em seguida, os 3 cones foram transferidos a um microtubo esterilizado contendo 1000 µL de solução salina, obtendo diluição de 10⁻¹ do conteúdo coletado do interior do canal

radicular. O tubo foi submetido à vibração em um agitador de tubos por 30 segundos, a fim de promover a remoção dos espécimes aderidos, transferindo 100 µL do conteúdo para outros microtubos com 900 µL. A partir dessa suspensão microbiológica inicial, foram feitas diluições decimais sucessivas para serem semeadas em duplicata nas placas contendo ágar MacConkey, ágar Slanetz-Bartley e ágar Sabouraud Dextrose com cloranfenicol 0,01%, para analisar o crescimento de *E.coli*, *E. faecalis* e *C. albicans*, respectivamente. A leitura dos resultados foi realizada após 48 horas de incubação das placas em estufa $37\pm 1^{\circ}\text{C}$, sendo avaliada pela contagem de Unidades Formadoras de Colônia por mililitro (UFC/mL). Todas as amostras microbiológicas dos grupos experimentais apresentaram os valores de UFC/mL obtidos de cada espécime, após as coletas. Os resultados foram representados com média, mediana e desvio padrão. Para a análise estatística, foi utilizado o software Jamovi versão 2.4.1.1 com nível de significância de 5%. Inicialmente, foram realizados os testes de normalidade de Shapiro Wilk, que apontaram anormalidade em todos os grupos e, posteriormente, os testes de Kruskal Wallis. As comparações foram realizadas inicialmente

intragrupos. Para isso, foram analisados somente os espécimes de cada grupo e, para a análise, somente dos resultados da 3ª coleta, todos os espécimes reunidos de cada grupo foram comparados. As comparações intragrupos demonstraram um padrão em todos eles, onde foi possível perceber que, na 1ª coleta, os microrganismos estavam presentes em números elevados; na 2ª coleta, os valores de UFC/mL reduziram significativamente no grupo controle e não foram detectados, após a terapia, nos dois grupos com a TFD e no grupo do hidróxido de cálcio agitado; na 3ª coleta, esses números proliferaram, demonstrando um crescimento microbiano na coleta tardia, exceto no grupo do hidróxido de cálcio, que não detectou nenhum microrganismo. Ao comparar as coletas, para todos os grupos, obteve-seo seguinte resultado: 1ª coleta > 2ª coleta < 3ª coleta ($p < 0.001$). Na comparação intergrupos, foi possível perceber que o grupo controle apresentou a maior quantidade microbiana na coleta tardia, seguido pelo grupo TFD laser sem agitação e, por último, com os menores índices, o grupo da TFD com agitação ($p < 0.001$). Não foram identificados microrganismos na coleta tardia nos grupos medicados com hidróxido de

cálcio. Pôde-se concluir que o protocolo de irrigação final promoveu redução significativa sobre o biofilme multiespécies; a terapia fotodinâmica foi mais eficiente que a irrigação isoladamente; a terapia fotodinâmica associada à agitação com Easy Clean foi mais eficaz na redução dos microrganismos do que a terapia sem agitação; a terapia fotodinâmica associada à agitação com Easy Clean, na coleta tardia, promoveu maior efeito antimicrobiano; não se detectaram microrganismos na coleta tardia quando se medicou hidróxido de cálcio com ou sem agitação; e o hidróxido de cálcio agitado promoveu maior efeito antimicrobiano do que usado sem agitação. Espera-se que os resultados contribuam para o entendimento da correta limpeza do sistema de canais radiculares durante o tratamento endodôntico, em benefício direto à ciência e indiretamente aos pacientes submetidos a esse tratamento.