



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Odontologia

Miguel Angelo da Cunha Neto

Atividade antimicrobiana de diferentes medicações usadas em técnicas regenerativas endodônticas sobre o biofilme de *Enterococcus faecalis*: análise por Microscopia Confocal de Varredura a Laser

Rio de Janeiro

2020

Miguel Angelo da Cunha Neto

Atividade antimicrobiana de diferentes medicações usadas em técnicas regenerativas endodônticas sobre o biofilme de *Enterococcus faecalis*: análise por Microscopia Confocal de Varredura a Laser

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Endodontia

Orientadores: Prof.^a Dra. Luciana Moura Sassone
Prof.^a Dra. Flaviana Bombarda de Andrade

Rio de Janeiro
2020

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/CBB

C972

Cunha Neto, Miguel Angelo da.

Atividade antimicrobiana de diferentes medicações usadas em técnicas regenerativas endodônticas sobre o biofilme *Enterococcus faecalis*: análise por microscopia confocal de varredura a laser / Miguel Angelo da Cunha Neto. – 2020.

79 f.

Orientadoras: Luciana Moura Sassone, Flaviana Bombarda de Andrade.
Dissertação (mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Odontologia.

1. Antibacterianos. 2. Endodontia. 3. Descontaminação. 4. Microscopia confocal. 5. *Enterococcus faecalis*. I. Sassone, Luciana Moura. II. Andrade, Flaviana Bombarda de. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Odontologia. IV. Título.

CDU
616.314

Kárin Cardoso CRB/7 6287

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Miguel Angelo da Cunha Neto

Atividade antimicrobiana de diferentes medicações antibióticas usadas em técnicas regenerativas endodônticas sobre o biofilme de *Enterococcus faecalis*: análise por Microscopia Confocal de Varredura a Laser

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Endodontia

Aprovada em 20 de Fevereiro de 2020.

Orientadores: Prof.^a Dra. Luciana Moura Sassone
Faculdade de Odontologia - UERJ

Prof.^a Dra. Flaviana Bombarda de Andrade
Universidade de São Paulo

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Emmanuel João Nogueira Leal da Silva
Faculdade de Odontologia – UERJ

Prof.^a Dra Sandra Rivera Fidel
Faculdade de Odontologia - UERJ

Prof. Dr. Marcos da Veiga Kalil
Universidade Federal Fluminense

Rio de Janeiro

2020

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho,

Aos meus pais, Elisabeth e Miguel Angelo, por todo amor e dedicação ao longo desses anos, por não pouparem esforços para que eu pudesse alcançar meus objetivos e para que eu nunca desistisse dos meus sonhos.

À minha querida esposa, Raphaela, pelo amor e carinho, e por ter embarcado comigo neste projeto, apoiando-me de forma incansável e sendo meu porto seguro em todos os momentos.

À minha filha, Manuela, que antes mesmo de nascer já me enche de felicidade, que tem sido a esperança, a fé e a força para que eu continue firme. Papai te ama!

À minha irmã Vivian (*in memoriam*), que foi a minha grande parceira nessa vida, que sempre me incentivou e vibrou com as minhas conquistas como se fossem suas. Você estará sempre em nossos pensamentos e orações. Nós te amamos muito!

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, professora Dra. Luciana Moura Sassone, pelos inúmeros ensinamentos durante a minha trajetória acadêmica na Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ) desde a graduação. Obrigado pelo carinho, paciência e dedicação.

À professora Dra. Flaviana Bombarda de Andrade, por ter aceitado o convite para coorientar este trabalho, pelo carinho e ensinamentos. Espero que essa parceria tenha sido a primeira de muitas.

Ao professor Dr. Emmanuel João Nogueira Leal da Silva, por ter acreditado em mim e por ser, atualmente, um exemplo de profissional na Endodontia, que nos inspira a mergulharmos de cabeça na pesquisa de qualidade. Suas aulas sempre dinâmicas e de muita qualidade somaram muito à minha formação.

À professora Dra. Teresa Cristina Ávila Berlinck, pelo carinho que sempre demonstrou por mim desde o meu início na odontologia. Lembro-me de uma troca de emails, no final de 2010, em que lhe contava os caminhos que havia percorrido após o término da minha graduação e os meus planos, a senhora disse o quanto ficava orgulhosa de mim, que eu sabia aproveitar as oportunidades e delas fazer o meu melhor, terminando com um “te admiro, sou sua fã!”, suas palavras naquele momento foram muito importantes e serviram-me de incentivo, reencontrá-la no início do mestrado foi muito gratificante.

Ao professor Dr. Raphael Hirata Junior (*in memoriam*), pela disponibilidade apresentada em ser meu coorientador no primeiro projeto do curso, e pelo exemplo de profissional dedicado e pessoa do bem que sempre nos demonstrou ser. Sua partida foi uma perda irreparável para todos nós.

À professora Dra. Sandra Rivera Fidel, pela oportunidade e confiança depositadas em mim no momento em que me permitiu realizar o Mestrado em Endodontia da UERJ.

À professora Dra. Ana Paula Pires dos Santos, pelos ensinamentos sobre revisão sistemática e meta-análise, e pelo carinho de sempre.

À técnica Barbara Coelho de Paula, do laboratório de Endodontia da Faculdade de Odontologia da UERJ, pela dedicação e prestatividade em todos os momentos que precisei.

À técnica Márcia S. Z. Graeff do laboratório de Microscopia Confocal de Varredura a Laser, da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP, pela eficiência na execução das análises e pela receptividade.

À analista de Laboratório (LAMP) – Unigranrio, Ana Beatriz Machado pelo ensinamento de cultura de células.

Aos profissionais da clínica de Odontologia da Policlínica Piquet Carneiro (PPC) – UERJ, pela parceria nesses dois anos de atividades.

Aos alunos de graduação, que através da troca de experiências foram fundamentais para o meu aprendizado.

Aos amigos da Pós-graduação, Ane Poly, Carolina Oliveira, Cláudio Malizia, Milena Tomaz, Nancy Kudsi, e em especial, Ana Flávia Barbosa, Carla Mendonça e Karem Pinto, pela amizade e parceria durante esse período, sem vocês, tudo teria sido mais difícil. Espero encontrá-los em outras oportunidades, desejo a todos muito sucesso!

A aluna de pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP, Jéssica Coelho, pela ajuda na confecção dessa pesquisa, com seu lema “tudo vai dar certo!” sempre esteve disposta a colaborar da melhor maneira possível para a concretização deste trabalho, palavras não serão suficientes para agradecê-la. Que sua jornada seja brilhante.

Aos funcionários da secretaria de Pós-Graduação que sempre foram muito solícitos.

À Faculdade de Odontologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro - UERJ, pela oportunidade de ter cursado o Mestrado em Endodontia.

À Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB USP, pela parceria na realização deste estudo.

A todos os professores que ao longo desses anos se dedicaram a grande função de lecionar e que foram fundamentais à minha formação.

RESUMO

CUNHA NETO, Miguel Angelo. *Atividade antimicrobiana de diferentes medicações antibióticas usadas em técnicas regenerativas endodônticas sobre o biofilme de *Enterococcus faecalis*: análise por Microscopia Confocal de Varredura a Laser*. 2020. 79f. Dissertação (Mestrado em endodontia) - Faculdade de Odontologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

O presente estudo teve como objetivo avaliar e quantificar, por meio de análise com Microscopia Confocal de Varredura a Laser (MCVL), o grau de desinfecção proporcionado por diferentes medicações antibióticas, utilizadas em técnicas regenerativas endodônticas, em diferentes formulações e consistências, sobre o biofilme de *Enterococcus faecalis* formado em dentina, comparando-as ao hidróxido de cálcio. Foram confeccionados 77 cilindros de dentina humana, os quais foram contaminados com uma cultura de *E. faecalis*, por cinco dias, para a formação de biofilme intratubular. As amostras foram divididas em seis grupos antibióticos (n=10, cada) de acordo com a formulação da medicação antibiótica testada e da sua consistência, um grupo com pasta de hidróxido de cálcio (n=10), e um grupo controle positivo (n=7). Grupo TAP/MP: medicação triantibiótica (ciprofloxacina, metronidazol e minociclina) em consistência sólida (veículos: propilenoglicol e macrogol); Grupo TAP/MPmod: medicação triantibiótica (ciprofloxacina, metronidazol e clindamicina) em consistência sólida (veículos: propilenoglicol e macrogol); Grupo BAP/MP medicação biantibiótica (ciprofloxacina e metronidazol) em consistência sólida (veículos: propilenoglicol e macrogol); Grupo TAP: medicação triantibiótica (ciprofloxacina, metronidazol e minociclina) em consistência fluida (veículo: propilenoglicol); Grupo TAPmod: medicação triantibiótica (ciprofloxacina, metronidazol e clindamicina) em consistência fluida (veículo: propilenoglicol); Grupo BAP: medicação biantibiótica (ciprofloxacina e metronidazol) em consistência fluida (veículo: propilenoglicol); Grupo HC (pasta de hidróxido de cálcio, veículo: propilenoglicol); Grupo CP: controle positivo (espécimes contaminados sem aplicação de medicação). Após a aplicação e manutenção das medicações por 14 dias, os cilindros de dentina foram cortados longitudinalmente e, nas superfícies, aplicado o corante fluorescente LIVE/DEAD *BacLight Bacterial Viability solution* para análise por meio de MCVL. As imagens obtidas no MCVL foram convertidas utilizando-se o programa *Leica Software Application Suite-Advanced Fluorescence* e processadas no *software BioImageLTM v21*, para quantificação da porcentagem de bactérias viáveis (verde) e não viáveis (vermelho). A distribuição não normal dos dados foi confirmada pelo Teste Shapiro-Wilk, sendo então realizado o teste estatístico Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn para comparação múltipla entre os grupos. O nível de significância estabelecido foi de 5% ($P < 0,05$). Obtiveram os melhores resultados em relação à ação antimicrobiana, os grupos: TAP/MP, TAP/MPmod, TAPmod e BAP. Nenhuma das medicações foi capaz de eliminar 100% das bactérias do biofilme intratubular. Pode-se concluir que as pastas TAPmod, BAP e HC são efetivas na desinfecção intratubular do biofilme de *E. faecalis*.

Palavras-chave: Medicamentos antibióticos. Endodontia. Descontaminação. Microscopia Confocal de Varredura a Laser.

ABSTRACT

CUNHA NETO, Miguel Angelo. *Antimicrobial activity of different antibiotic medications used in endodontic regenerative techniques against strains of Enterococcus faecalis: analysis by Confocal Scanning Laser Microscopy*. 2020. 79f. Dissertação (Mestrado em endodontia) - Faculdade de Odontologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

The aim of the present study was to evaluate and quantify by Confocal Scanning Laser Microscopy (CSLM) analysis, the degree of disinfection provided by different antibiotic medications used in endodontic regenerative techniques, in different formulations and consistencies against strains of *Enterococcus faecalis* formed in human dentin and comparing to calcium hydroxide. Seventy seven samples of dentin cylinders were contaminated with a culture of *E. faecalis* for 5 days to form an intratubular biofilm. Samples were divided in six antibiotic groups (n=10, each) according to the formulation of the antibiotic medication tested and their consistency, one group with calcium hydroxide paste (n=10) and one control groups (n=7). TAP/MP group: triple antibiotic medication (ciprofloxacin, metronidazole and minocycline) in solid consistency (vehicles: propylene glycol and macrogol); TAP/MPmod group: triple antibiotic medication (ciprofloxacin, metronidazole and clindamycin) in solid consistency (vehicles: propylene glycol and macrogol); Group BAP/MP: double antibiotic medication (ciprofloxacin and metronidazole) in solid consistency (vehicles: propylene glycol and macrogol); TAP group: triple antibiotic medication (ciprofloxacin, metronidazole and minocycline) in fluid consistency (vehicle: propylene glycol); TAPmod group: triple antibiotic medication (ciprofloxacin, metronidazole and clindamycin) in fluid consistency (vehicle: propylene glycol); BAP group: double antibiotic medication (ciprofloxacin and metronidazole) in fluid consistency (vehicle: propylene glycol); CH group (calcium hydroxide paste, propylene glycol as a vehicle); Group CP: positive control, contaminated, but without antibiotic application. After application of antibiotic medications for 14 days, dentin cylinders were cut lengthwise and the surfaces stained with the fluorescence dye LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability solution and analyzed through CSLM. The images obtained in the CLSM were converted by Leica Software Application Suite-Advanced Fluorescence (Mannheim, Baden-Württemberg, Germany) and after processing in the BioImageLTM v21 software for quantification of the percentage of viable (green) and non-viable (red) bacteria. The non-normal distribution of data was confirmed by the Shapiro-Wilk test, then the Kruskal-Wallis statistical test was performed followed by the Dunn test for multiple comparison between the groups. The level of significance was set at 5% ($P < 0,05$). The groups that obtained the best results in relation to antimicrobial action were: TAP/MP, TAP/MPmod, TAPmod and BAP. None of the medications eliminated 100% of the bacteria from the intratubular biofilm. It can be concluded that TAPmod, BAP and CH pastes are effective in the intratubular disinfection of the *E. faecalis*

Keywords: Antibiotic medications. Endodontics. Descontamination. Confocal Laser Scanning Microscopy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Radiografias periapicais realizadas para a seleção dos espécimes	34
Figura 2 -	Preparo das amostras: confecção dos cilindros de dentina	35
Figura 3 -	Preparo da cultura e contaminação dos espécimes	38
Figura 4 -	Medicações antibióticas, pó das combinações e veículos.....	41
Figura 5 -	Medicações antibióticas em consistência sólida.	42
Figura 6 -	Preparo das medicações na consistência fluida.	43
Figura 7 -	Montagem dos espécimes para aplicação da medicação sólida e para manutenção na estufa por 14 dias.	44
Figura 8 -	Preparo dos espécimes para análise por MCVL	45
Figura 9 -	Montagem dos espécimes para análise por MCVL	46
Figura 10 -	MCVL.....	47
Figura 11 -	Cilindro de dentina seccionado e áreas analisadas pela MCVL.	47
Figura 12 -	Imagens ilustrativas obtidas por MCVL da viabilidade microbiana dos diferentes grupos experimentais após 14 dias de incubação em estufa.	61
Figura 13 -	Reconstrução tridimensional das imagens da MCVL dos biofilmes dos grupos experimentais que utilizaram o macrogol e o propilenoglicol como veículo e o grupo controle positivo, após 14 dias de incubação em estufa.	62

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Porcentagem de bactérias viáveis para cada grupo experimental.....	50
Gráfico 2 -	Porcentagem de bactérias viáveis na região cervical para cada grupo experimental.....	52
Gráfico 3 -	Porcentagem de bactérias viáveis na região apical para cada grupo experimental.....	53
Gráfico 4 -	Porcentagem de bactérias viáveis na região mais superficial para cada grupo experimental.....	55
Gráfico 5 -	Porcentagem de bactérias viáveis na região mais profunda para cada grupo experimental.....	56
Gráfico 6 -	Porcentagem de bactérias viáveis para cada grupo experimental com consistência sólida.	58
Gráfico 7 -	Porcentagem de bactérias viáveis para cada grupo experimental com consistência fluida.....	59
Gráfico 8 -	Porcentagem de bactérias viáveis para cada grupo experimental comparando-se os diferentes veículos, independente das medicações antibióticas utilizadas...	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Valores da Mediana (med) e, mínimo e máximo (min-max) da porcentagem de células vivas do biofilme de <i>E. faecalis</i> em cada um dos grupos experimentais, após contato com as medicações por 14 dias.	50
Tabela 2 -	Valores da Mediana (med) e, mínimo e máximo (min-max) da porcentagem de células vivas do biofilme de <i>E. faecalis</i> da região cervical em cada um dos grupos experimentais, após contato com as medicações por 14 dias.	51
Tabela 3 -	Valores da Mediana (med), mínimo e máximo (min-max) da porcentagem de células vivas do biofilme de <i>E. faecalis</i> da região apical em cada um dos grupos experimentais, após contato com as medicações por 14 dias.	53
Tabela 4 -	Valores da Mediana (med), mínimo e máximo (min-max) da porcentagem de células vivas do biofilme de <i>E. faecalis</i> da região mais superficial em cada um dos grupos experimentais, após contato com as medicações por 14 dias.	54
Tabela 5 -	Tabela 5 - Valores da Mediana (med) e, mínimo e máximo (min-max) da porcentagem de células vivas do biofilme de <i>E. faecalis</i> da região mais profunda em cada um dos grupos experimentais, após contato com as medicações por 14 dias.	56
Tabela 6 -	Tabela 6 - Valores da Mediana (med), mínimo e máximo (min-max) da porcentagem de células vivas do biofilme de <i>E. faecalis</i> em cada um dos grupos experimentais, tendo o macrogol e propilenoglicol como veículo.	57
Tabela 7 -	Valores da Mediana (med), mínimo e máximo (min-max) da porcentagem de células vivas do biofilme de <i>E. faecalis</i> em cada um dos grupos experimentais, tendo o propilenoglicol como veículo.	59
Tabela 8 -	Valores da Mediana (med), mínimo e máximo (min-max) da porcentagem de células vivas do biofilme de <i>E. faecalis</i> , após contato com os grupos experimentais por 14 dias, comparando-se os diferentes veículos, independente das medicações antibióticas utilizadas.	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAE	Associação Americana de Endodontia
ATCC	American type culture collection
BAP	Pasta biantibiótica
BHI	Brain Heart Infusion, caldo infusão cérebro coração
Ca(OH) ₂	Hidróxido de cálcio
CHX	Clorexidina
CPKE	Ciprofloxacina + cetoconazol
CPMTKE	Ciprofloxacina + metronidazol + cetoconazol
CSLM	Confocal Scanning Laser Microscopy, Microscopia Confocal de Varredura a Laser
DPSC	Células-tronco da polpa dentária
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
KE	Cetoconazol
LSTR	Terapia de esterilização da lesão e reparo tecidual
MCVL	Microscopia Confocal de Varredura a Laser
MT	Metronidazol
MTKE	Metronidazol + cetoconazol
MTA	Agregado de trióxido mineral
NaOCl	Hipoclorito de Sódio
RET	Tratamento endodôntico regenerativo
SCAPS	Células-tronco da papila apical
SCR	Sistema de Canais Radiculares
TAP	Pasta triantibiótica
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFC/mL	Unidade formadora de colônia por mililitros
UFCs	Unidades Formadoras de Colônias
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro

LISTA DE SÍMBOLOS

μL	Microlitros
μm	Micrometros
%	Porcentagem
$^{\circ}\text{C}$	Grau Celsius
g	Gramma
mg	Miligramma
mm	Milímetros
min	Minutos
mL	Mililitros
M	Concentração molar
U.I	Unidades Internacionais

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	15
1	REVISÃO DE LITERATURA	18
1.1	Ação antibacteriana das medicações antibióticas	18
1.2	Revascularização pulpar com medicação antibiótica	22
1.3	Citotoxicidade das medicações antibióticas	25
1.4	Medicações antibióticas x Células-tronco pulpares	26
1.5	Medicações antibióticas x Veículos	27
1.6	Concentração das medicações antibióticas.....	28
1.7	Medicações antibióticas x Alteração da coloração dentária.....	29
2	PROPOSIÇÃO	32
2.1	Objetivo geral	32
2.2	Objetivos específicos.....	32
2.3	Hipóteses	32
3	METODOLOGIA	34
3.1	Seleção dos espécimes.....	34
3.2	Preparo das amostras	34
3.3	Preparo da cultura, inóculo e incubação.....	35
3.4	Preparo e aplicação das medicações.....	39
3.5	Preparo para MCVL	44
3.6	Análise por MCVL	46
3.7	Análise estatística	48
4	RESULTADOS	49
4.1	Viabilidade total	49
4.2	Viabilidade por regiões.....	50
4.2.1	Região cervical	50
4.2.2	Região apical	52
4.3	Viabilidade por profundidade.....	53
4.3.1	Superficial.....	53
4.3.2	Profunda	55
4.4	Viabilidade por consistência.....	56

4.4.1	Consistência sólida	57
4.4.2	Consistência fluida	58
4.5	Consistência sólida x Consistência fluida dos grupos antibióticos	59
5	DISCUSSÃO	63
	CONCLUSÃO	69
	REFERÊNCIAS	70
	ANEXO - Parecer do comitê de Ética em pesquisa	77

INTRODUÇÃO

A ocorrência de trauma ou de infecção em um elemento dentário pode ocasionar necrose pulpar. Quando essa perda de vitalidade acontece em um dente com rizogênese incompleta, há uma interrupção no seu desenvolvimento, resultando em raízes curtas, ápices amplos e paredes dentinárias finas e frágeis (SHAH et al., 2008; TZIAFAS; KODONAS, 2010). Diante desses casos, as terapias mais indicadas têm sido a apicificação e a revascularização (BOSE; NUMMIKOSKI; HARGREAVES, 2009).

De acordo com o glossário de termos endodônticos da Associação Americana de Endodontia (AAE) (AAE, 2019) a apicificação consiste em um método para indução de uma barreira calcificada em uma raiz com um ápice aberto em um dente com polpa necrótica. É uma das terapias mais executadas para esses casos (KUMAR et al., 2011). Em sua prática, são utilizados materiais como o hidróxido de cálcio (Ca(OH)_2) (CVEK, 1992; RAFTER, 2005) ou o Agregado de Trióxido Mineral (MTA, em inglês) (WITHERSPOON, 2008) com o objetivo de possibilitar a compactação do material obturador sem extravasá-lo (BOSE; NUMMIKOSKI; HARGREAVES, 2009; SHAH, et al., 2008).

Na apicificação, utilizando-se Ca(OH)_2 , são realizadas trocas sucessivas da medicação e por isso, leva-se um longo período de tempo até a formação de uma barreira apical de tecido calcificado (CVEK, 1992; KAMOLTHIP, 2020). Já a terapia com MTA, permite uma compactação imediata do material obturador após a sua aplicação (WITHERSPOON et al., 2008).

Alternativa à apicificação, a terapia de revascularização tem como objetivo a complementação da formação radicular, propiciando um fechamento apical, um espessamento da dentina intrarradicular e um aumento do comprimento da raiz (DIOGENES et al., 2014), reduzindo o risco de fratura do elemento dentário (BANCHS; TROPE, 2004; SHAH et al., 2008). Os princípios mais importantes da terapia são: a eliminação de microrganismos dos canais radiculares, a criação de um arcabouço para o crescimento do novo tecido e a prevenção de reinfecção (LAW, 2013).

O protocolo de revascularização recomendado pela AAE (<https://www.aae.org>) em um primeiro momento consiste no acesso ao dente com polpa necrosada, irrigação com hipoclorito de sódio (NaOCl) a 1,5% sem instrumentá-lo, irrigação com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 17%, secagem do canal radicular com cone de papel e colocação de uma medicação intracanal para potencializar a descontaminação. Numa segunda

sessão, o canal radicular deve ser irrigado com EDTA 17% e uma estimulação da região periapical com um instrumento endodôntico deverá ser realizada para promover um sangramento, que preencherá o canal radicular. Por fim, o elemento deve ser selado internamente com MTA, no terço cervical, abaixo da junção amelocementária, e com resina fotopolimerizável na porção coronária, para impedir sua recontaminação.

A terapia de revascularização com pasta triantibiótica (TAP) baseada no conceito de “esterilização da lesão e reparo tecidual” ou LSTR (HOSHINO; TAKUSHIGE, 1998), consiste numa combinação de três antibióticos: ciprofloxacina, metronidazol e minociclina (SATO et al., 1992). A TAP tem se mostrado adequada para o tratamento do Sistema de Canais Radiculares (SCR) com polpa necrosada e rizogênese incompleta em relação ao controle da infecção, pois permite alguma ação contra biofilmes (MONTERO-MIRALLES et al., 2018; REYNOLDS; JOHNSON; COHENCA 2019; SABRAH et al., 2015) e continuidade no desenvolvimento radicular (BOSE; NUMMIKOSKI; HARGREAVES, 2009).

Contudo, uma questão importante a respeito do uso da TAP está relacionada às combinações de princípios ativos, concentrações destes e seus veículos. Essas medicações precisam ser capazes de eliminar o biofilme endodôntico sem, contudo, serem citotóxicas às células precursoras do novo tecido que se pretende estimular além de não gerarem respostas inflamatórias que possam limitar o processo de revascularização/regeneração. Acredita-se que remanescentes de tecido vital e células sobreviventes ao redor do ápice que possuem potencial de diferenciação sejam as possíveis fontes celulares (CHUEH et al., 2009; COTTI; MEREU; LUSSO, 2008), porém, a literatura ainda é carente de dados a esse respeito (RUPAREL et al., 2012; SARMA et al., 2016).

Ressalta-se, ainda, um ponto que merece especial atenção sobre a TAP, que é a presença de minociclina em sua composição. Estudos apontam a minociclina, como um composto capaz de acarretar alteração de cor no elemento dentário (KAHLER, ROSSI-FEDELE, 2016; MONTERO-MIRALLES et al., 2018). Devido a isso, diferentes formulações de medicações antibióticas vêm sendo testadas com o objetivo de diminuir ou mesmo impedir esse comprometimento estético, sem, contudo, diminuir a capacidade antimicrobiana da medicação (ALGARNI; YASSEN; GREGORY, 2015; JENKS et al., 2016; PORTER, et al., 2016; TAGELSIR et al., 2016). A clindamicina tem sido recomendada pela AAE como uma substituta à minociclina por não proporcionar descoloração coronária (<https://www.aae.org>).

Destaca-se que os veículos utilizados como carreadores das medicações podem interferir nas propriedades dos materiais utilizados em endodontia (LEONARDO et al., 1993),

entretanto, poucos estudos existem sobre qual seria o veículo mais eficiente para técnicas regenerativas endodônticas (HWANG et al., 2018).

A Microscopia Confocal de Varredura a Laser (MCVL) tem sido utilizada em pesquisas laboratoriais pois fornece imagens e informações precisas do interior dos túbulos dentinários, além de permitir reconstruções tridimensionais a partir dos dados digitais (MARCIANO et al., 2010). Possibilita, ainda, a confirmação da profundidade de penetração dos microrganismos dentro dos túbulos dentinários (ANDRADE et al. 2015).

Até o momento, não há estudos que avaliem a eficácia de desinfecção dentinária intratubular da pasta TAP/MP. Portanto, este trabalho foi proposto, visando comparar a desinfecção intratubular das medicações: TAP/MP, TAP/MPmod, BAP/MP, TAP, TAPmod, BAP e HC, utilizando a Microscopia Confocal de Varredura a Laser. A hipótese nula foi que não haveria diferença no potencial de desinfecção entre as medicações testadas.

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Ação antibacteriana das medicações antibióticas

Sato et al. (1992) estudaram, *in vitro*, o efeito bactericida da mistura de ciprofloxacina, metronidazol e minociclina, com e sem adição de rifampicina, contra bactérias de cárie e lesões endodônticas de dentes humanos decíduos. A combinação das misturas na concentração de 100µg/mL inibiu o crescimento das bactérias nas amostras e também foi efetiva nas bactérias das placas dentais formadas nos dentes decíduos.

Hoshino et al. (1996) avaliaram o efeito antibacteriano da mistura de ciprofloxacina, metronidazol e minociclina, com e sem adição de rifampicina, em bactérias retiradas da dentina radicular infectada e de polpas infectadas. Os medicamentos, quando sozinhos, não foram capazes de eliminar todas as bactérias. Entretanto, quando combinados na concentração de 25 µg/mL, a pasta triantibiótica eliminou totalmente as bactérias, concluindo que a eficácia bactericida da combinação de drogas é suficientemente potente para erradicar bactérias da dentina infectada dos canais radiculares.

Sato et al. (1996) estudaram o potencial da mistura de ciprofloxacina, metronidazol e minociclina (0,5mg de cada droga) em eliminar bactérias presentes nas camadas mais profundas da dentina radicular realizando três experimentos que avaliaram: a sobrevivência de *Escherichia coli* em cavidades preparadas a 1 mm do canal radicular, onde foram aplicados os antibióticos; a penetração da combinação das medicações através da dentina; e a eficácia da combinação *in situ*, contra bactérias na dentina radicular infectada. O trabalho demonstrou a eficácia da combinação das drogas contra essas bactérias quando os canais radiculares foram irrigados previamente com EDTA 0.4M e agitados por ultrassom, para permitir a penetração da mistura das drogas através da dentina.

Windley et al. (2005) avaliaram a eficácia da pasta triantibiótica na desinfecção de dentes imaturos de cães com periodontite apical. Os grupos amostrais foram antes (S1) e após (S2) a irrigação com NaOCl a 1,25% e após o curativo com TAP (S3), composta por metronidazol, ciprofloxacina e minociclina. Em S1, 100% das amostras apresentaram culturas bacterianas positivas, com uma contagem média de Unidade Formadora de Colônias (UFC) de $1,7 \times 10^8$. No S2, 90% das amostras foram positivas para crescimento bacteriano, com uma contagem média de UFC de $1,4 \times 10^4$. No S3, 30% das amostras apresentaram cultura positiva

com uma contagem média de UFC de apenas 26. As reduções nas contagens médias de UFC entre S1 e S2 bem como entre S2 e S3 foram estatisticamente significativas, o que indicaram a eficácia da pasta triantibiótica na desinfecção de dentes imaturos com periodontite apical.

Mohammadi e Abbott (2009) realizaram uma revisão de literatura sobre a utilização de antibióticos e agentes a base de antibióticos na endodontia e traumatologia dentária. Puderam concluir que a aplicação local desses medicamentos parece ser uma forma mais efetiva de administração que a sistêmica. A pasta triantibiótica foi relatada como muito eficaz da desinfecção do sistema de canais radiculares.

Sabrah et al. (2015) compararam o efeito antimicrobiano da pasta triantibiótica, biantibiótica e do hidróxido de cálcio contra o biofilme de *E. faecalis* e *Porphyromonas gingivalis*. Os autores puderam concluir que as pastas triantibiótica e biantibiótica foram mais efetivas do que o Ca(OH)_2 , sendo a biantibiótica, considerada uma boa substituta a triantibiótica.

Adl et al. (2014) avaliaram a habilidade da pasta triantibiótica e do hidróxido de cálcio na desinfecção dos túbulos dentinários. Blocos de dentina foram contaminados com *E. faecalis* e após 21 dias, foram tratados com salina, TAP ou HC. Através da contagem de UFC os autores puderam concluir que a TAP foi mais efetiva na desinfecção do canal comparada ao HC.

Albuquerque et. al (2015) avaliaram in vitro os efeitos da ciprofloxacina contendo matriz de polímeros contra biofilmes de *E. faecalis*. Esse estudo, in vitro, utilizou incisivos inferiores humanos, que foram seccionados longitudinalmente para a confecção dos espécimes. Pôde-se concluir que essa forma de administração é promissora como medicação intracanal para redução da infecção antes de procedimentos regenerativos.

Reyhani et al. (2015) avaliaram o efeito antimicrobiano da TAP nas concentrações: 0,01, 0,1, 1, 10, 100 e 1000 mg/mL em intervalos de 1, 2, 3 e 4 semanas sobre o biofilme maduro de *E. faecalis*. Foram utilizados 287 incisivos centrais humanos extraídos, que após serem preparados e infectados, tiveram seus canais preenchidos pelas medicações ou por salina (controle). A técnica de contagem de UFCs foi utilizada e os resultados mostraram que TAP eliminou completamente o biofilme de *E. faecalis* nas concentrações 1000, 100 e 10 mg/mL, enquanto as demais resultaram em reduções significativas de UFCs quando comparadas ao grupo controle positivo. Os autores puderam concluir que as baixas concentrações da TAP são capazes de erradicar o biofilme de *E. faecalis*, reduzindo os efeitos colaterais das altas concentrações.

Devaraj, Jagannathan e Neelakantan (2016) realizaram um estudo em que utilizaram, além de outras análises, a MCVL, para avaliar *in vitro* a eficácia de cinco medicações intracanáis contra um biofilme maduro de *E. faecalis*: Cúrcuma fotoativada, pasta triantibiótica (TAP), pasta biantibiótica (BAP), clorexidina (CHX) e $\text{Ca}(\text{OH})_2$. O tratamento com cúrcuma mostrou a maior porcentagem de células não viáveis a 200 e 400 μ , mas essa diferença não foi significativa em relação à TAP. Cúrcuma, TAP e BAP demonstraram uma significativa redução de CFU/mL comparadas ao grupo controle e às demais substâncias avaliadas.

Pereira et al (2017) compararam a atividade antimicrobiana intratubular da pasta de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e da TAP sobre o biofilme de *E. faecalis* formado em amostras padronizadas de dentes bovinos, após um novo protocolo de contaminação. Os espécimes foram divididos em dois grupos teste: $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e TAP. Após um período de quinze dias, foi realizada uma análise intratubular das amostras por MCVL, além de um experimento de cultura, com contagem de UFCs. Os autores demonstraram que a TAP teve um efeito antimicrobiano ligeiramente maior, contudo sem diferença significativa entre os grupos. Concluíram, portanto, que a pasta de $\text{Ca}(\text{OH})_2$, devido a sua capacidade de descontaminação intratubular, contra um biofilme de *E. faecalis*, similar à TAP, pode ser a medicação de escolha para técnicas regenerativas.

Ghabraei et al. (2018) determinaram e compararam o menor tempo necessário para TAP e $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + CHX 2% erradicarem o biofilme de *E. faecalis* do SCR. Foram selecionados 65 dentes humanos unirradiculares extraídos e com canais retos. A camada de *smear layer* foi removida com EDTA 17% e NaOCl 5,25%. Os dentes foram infectados com *E. faecalis* por uma semana, em seguida, TAP ou $\text{Ca}(\text{OH})_2$ misturado à CHX 2% foram inseridos nos canais. As raízes foram cortadas longitudinalmente e a carga bacteriana vital foi avaliada pela contagem do número de UFC. A pasta de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + CHX 2% foi capaz de erradicar o biofilme bacteriano em três dias, já a TAP o fez em sete dias. Os autores concluíram que o $\text{Ca}(\text{OH})_2$ misturado à CHX 2% foi mais potente que o TAP contra o biofilme de *E. faecalis* num tempo menor.

Zancan et al. (2018) estudaram a atividade antimicrobiana de medicações intracanáis contra o biofilme de *E. faecalis* e *Candida albicans*. Foram utilizados 55 incisivos bovinos com raízes completamente formadas, divididas em 11 grupos. Após a incubação para a maturação do biofilme, as amostras foram imersas nas pastas: 1 - $\text{Ca}(\text{OH})_2$, 2 - CHX, 3 - ciprofloxacina (CP), 4 - metronidazol (MT), 5 - cetoconazol (KE), 6 - BAP, 7 - TAP, 8 - ciprofloxacina + cetoconazol (CPKE); 9 - ciprofloxacina + metronidazol + cetoconazol (CPMTKE), 10 - metronidazol + cetoconazol (MTKE) e 11 - controle (CO) por sete dias. Em

seguida, os espécimes foram corados para análise por MCVL. Para o biofilme de *E. faecalis*, a menor porcentagem de bactérias vivas foi encontrada nos grupos TAP, BAP e CP; no entanto, os grupos KE, CPKE, CPMTKE e MTKE mostraram-se eficazes. Os autores concluíram que a pasta de Ca(OH)_2 e a CHX não foram eficazes para ambos os biofilmes e que as pastas TAP e BAP foram efetivas apenas contra biofilmes de *E. faecalis*.

Zargar et al. (2018) compararam o efeito antibacteriano de clindamicina 2% e TAP a 2% e a 100% de concentração, em um biofilme de *E. faecalis*. Túbulos dentinários de cem raízes de dentes humanos foram infectados e aleatoriamente atribuídos em cinco grupos. Um total de 1000 mg/mL de TAP, 20 mg/mL de TAP, 20 mg/mL de clindamicina, Ca(OH)_2 ou metilcelulose (controle) foram inseridos no canal radicular por uma semana. Após esse período, as raspas de dentina foram coletadas a 200 e 400 μm de profundidade e o número de UFCs por mg foi determinado. Foi observada que a redução de bactérias viáveis nos três primeiros grupos foi significativamente maior do que os grupos de Ca(OH)_2 e controle. No entanto, a eficácia antimicrobiana entre esses três grupos não foi significativamente diferentes um do outro. Não houve diferença significativa entre os dados em 200 e 400 μm em todos os grupos, exceto o grupo Ca(OH)_2 , que apresentou eficácia antimicrobiana apenas a 200 μm . Os autores concluíram que o efeito antibiofilme da clindamicina foi comparável com TAP, podendo ser utilizada em substituição à TAP.

Arruda et al. (2018) realizaram um estudo clínico randomizado onde comparam a efetividade antibacteriana da solução triantibiótica (minociclina, metronidazol e ciprofloxacina) a 1mg/mL e da pasta de Ca(OH)_2 /CHX como medicação intracanal entre consultas em dentes com periodontite apical primária. A análise da redução total bacteriana foi realizada utilizando-se o ensaio de PCR antes do preparo químico-mecânico (S1), após o preparo (S2), e após a medicação intracanal (S3). Os autores concluíram que a medicação com solução triantibiótica numa concentração de 1mg/mL aumentou a desinfecção do canal, efeito comparável com a pasta de Ca(OH)_2 /CHX.

Eslami (2019) comparou os efeitos antimicrobianos da TAP, do Ca(OH)_2 , da terapia fotodinâmica (PDT), azul de toluidina (TOL), emissor de luz de diodo (LED) e laser diodo de 940 nm (DL) sobre biofilme de *E. faecalis* e *C. albicans* em 84 pré-molares humanos extraídos. As amostras foram divididas aleatoriamente em sete grupos (n=12), incluindo o controle. Em seguida, as amostras foram fixadas e observadas em microscópio eletrônico de varredura (MEV). Os resultados mostraram reduções significativas na espessura do biofilme em TAP, PDT e LED. A maior redução na espessura do biofilme foi observada no TAP; no entanto, as diferenças entre TAP e PDT e LED não foram significativas.

Zancan et al. (2019) avaliaram a atividade antimicrobiana da pasta de Ca(OH)_2 , BAP, Ca(OH)_2 adicionado a BAP ($\text{Ca(OH)}_2/\text{BAP}$) e TAP por MCVL. Para análise da desinfecção, o biofilme de *E. faecalis* foi induzido na superfície de discos de dentina (n=20) e as medicações aplicadas por um período de sete dias. A viabilidade bacteriana foi verificada por MCVL. Ca(OH)_2 e $\text{Ca(OH)}_2/\text{BAP}$ não apresentaram diferença significativa em relação ao grupo controle, enquanto, TAP e DAP apresentaram uma redução significativa. Os autores concluíram que a BAP é indicada para eliminar *E. faecalis*, visto que se comportou de forma similar a TAP. O acréscimo de Ca(OH)_2 a BAP reduziu seu efeito antibacteriano.

1.2 Revascularização pulpar com medicação antibiótica

Iwaya, Ikawa e Kubota (2001) demonstraram um caso de revascularização de um dente permanente imaturo que apresentava periodontite e fístula, onde foi utilizada como medicação intracanal uma combinação de ciprofloxacina e metronidazol, sem limpeza mecânica. Após um acompanhamento de trinta meses, pode-se observar espessamento das paredes radiculares e fechamento apical, afirmando que um canal radicular livre de bactérias possui um grande potencial para a revascularização.

Banchs e Trope (2004) apresentaram uma técnica para revascularização de dentes permanentes imaturos com periodontite apical, onde foi utilizada uma combinação de três antibióticos (ciprofloxacina, metronidazol e minociclina). Nesse estudo, houve continuidade no crescimento da raiz, espessamento das paredes e formação do ápice radicular. Os autores afirmam que a combinação de um canal desinfetado, uma matriz para o desenvolvimento de um novo tecido e um selamento coronário duplo parecem produzir um ambiente necessário para uma revascularização bem sucedida.

Bose, Nummikoski e Hargreaves (2009) realizaram um estudo retrospectivo envolvendo revascularização pulpar em dentes imaturos. Para isso, utilizaram radiografias de casos para avaliar o crescimento radicular, o espessamento das paredes dentinárias e a influência da medicação utilizada. Os resultados mostraram que o tratamento endodôntico regenerativo (RET) com TAP e o tratamento com Ca(OH)_2 produziram aumentos significativos no comprimento de raiz comparados ao grupos controle: apicificação com MTA e tratamentos radiculares não cirúrgicos. A TAP demonstrou, ainda, diferenças

significativamente maiores na espessura da parede da raiz do que os grupos Ca(OH)_2 ou formocresol.

Ding et al. (2009) avaliaram o efeito da revascularização pulpar em dentes imaturos necrosados com periodontite apical. A desinfecção do canal foi realizada, utilizando uma mistura triantibiótica (ciprofloxacina, metronidazol e minociclina) por 1 semana. Os dentes, em que o tratamento pôde ser finalizado, apresentaram desenvolvimento radicular completo, com uma resposta pulpar positiva. Os autores concluíram que a revascularização é clinicamente possível em dentes com essas condições e que essa técnica deve ser preferível em relação à apicificação. Antunes et al. (2015) realizaram uma revisão sistemática sobre a efetividade da revascularização pulpar na formação radicular de dentes permanentes imaturos com polpas necrosadas. Dos 277 artigos inicialmente selecionados, 11 permaneceram para avaliação. Os autores concluíram que, apesar dos relevantes resultados, as evidências científicas devem ser interpretadas com cautela devido aos parâmetros e métodos de avaliação serem diferentes. Segundo os autores, apesar da técnica de revascularização estimular o desenvolvimento do fechamento apical e o espessamento da dentina radicular, vários aspectos ainda permanecem desconhecidos, como os principais fatores envolvidos no reparo, o tipo de tecido formado e o prognóstico em longo prazo.

Bezgin et al. (2015) avaliaram clinicamente e radiograficamente a eficácia do plasma rico em plaquetas usado como arcabouço no tratamento regenerativo endodôntico, comparando com a técnica convencional que utiliza coágulo sanguíneo e pasta antibiótica contendo ciprofloxacina, metronidazol e cefaclor. Os autores concluíram que a técnica utilizando plasma rico em plaquetas, obteve sucesso na criação dessa matriz para o tratamento regenerativo, porém, o resultado tratamento não teve diferença significativa quando comparada a técnica convencional.

El Ashiry et al. (2016) avaliaram a terapia de revascularização de dentes permanentes com ápices abertos. Foram selecionados vinte pacientes para revascularização da polpa utilizando TAP (por uma a duas semanas) para desinfecção endodôntica. Os pacientes foram acompanhados por até 24 meses, permanecendo assintomáticos. Três casos de periodontite apical crônica mostraram desaparecimento clínico da fístula após duas semanas de tratamento. As radiografias revelaram redução da radiolucidez periapical de forma progressiva nos primeiros 12 meses e, entre 12 e 24 meses, os dentes tratados apresentaram aumento progressivo da espessura da parede dentinária, comprimento da raiz e desenvolvimento radicular, concluindo que os tratamentos foram bem sucedidos e que são necessários mais estudos para compreender os mecanismos da revascularização.

Latham et. AL (2016) avaliaram a eficácia da desinfecção dos atuais protocolos regenerativos em dentes permanentes prematuros necrosados. As medicações testadas foram: pasta triantibiótica e biantibiótica em três concentrações (10, 1, and 0.1 mg/mL) e pasta de hidróxido de cálcio. Os autores concluíram que nenhuma das medicações foi capaz de eliminar completamente as bactérias, e que é necessária uma avaliação entre o equilíbrio entre a toxicidade às células-tronco e a eliminação bacteriana para determinação das concentrações adequadas.

Fahmy et al. (2017) avaliaram o potencial de revascularização de dentes com polpas necrosadas seguindo diferentes protocolos. A infecção periapical foi induzida em 54 pré-molares maduros de cães e os dentes foram distribuídos em sete grupos: (1) BAP/coágulo de sangue, (2) Ciprofloxacina/colágeno, (3) BAP/colágeno, (4) TAP modificada/colágeno, (5) Ciprofloxacina/Gelfoam, (6) BAP/Gelfoam, e (7) TAP modificada/Gelfoam. Também foram reavaliados controles positivos e negativos incluindo dentes infectados e saudáveis, respectivamente (n=12 raízes/grupo). Os grupos com ciprofloxacina/colágeno e BAP/colágeno, apresentaram melhor crescimento dos tecidos corono-apicais, vascularização, formação de cimento e extensões inflamatórias significativamente mais baixas.

Montero-Miralles et al. (2018) em uma revisão de literatura, concluíram que os antibióticos utilizados em RETs são eficazes contra bactérias envolvidas em infecções endodônticas. As pastas triantibióticas com minociclina proporcionam a desinfecção completa dos dentes imaturos com polpas necróticas, sem afetar as SCAPs (células-tronco da papila apical). Estudos experimentais realizados em cães suportam o uso de antibióticos em REPs e estudos clínicos relatam altas taxas de sucesso do RET usando antibióticos como curativos intracanal. No entanto, a descoloração dentária é um importante efeito colateral do uso do TAP. Os autores sugerem que uma pasta antibiótica contendo apenas metronidazol e ciprofloxacina pode ser uma boa alternativa ao TAP.

Neelamurthy et al. (2018) avaliaram, a partir de um estudo *in vivo*, o procedimento de revascularização em dentes permanentes maduros e imaturos com necrose pulpar e ápice aberto, utilizando pasta triantibiótica, contendo ciprofloxacina, metronidazol e clindamicina na proporção de 1:1:1, seguida por indução do sangramento no canal radicular e formação do coágulo. Após dez meses de acompanhamento, dez de 13 pacientes mostraram desenvolvimento radicular e fechamento apical, oito de 13 mostraram desenvolvimento radicular, fechamento apical e aumento da espessura das paredes dentinárias radiculares e dois de 13 mostraram, ainda, resposta positiva ao teste elétrico de sensibilidade.

Ramezani, Sanaei-rad e Hajihassani (2019) apresentaram um caso clínico de um molar inferior imaturo necrosado que foi tratado com a técnica de revascularização baseado nas considerações clínicas da AAE. Três meses após o procedimento, o paciente encontrava-se assintomático, aos seis meses foi possível notar o início do fechamento apical e aos doze meses, as raízes mesial e distal mostraram maturação e fechamento apical, além de ausência de lesão periapical.

Simsek et al. (2019) investigaram o conteúdo mineral do canal radicular após aplicação de várias pastas antibióticas utilizando um raio-x detector de energia dispersiva. Cinquenta caninos superiores foram divididos em cinco grupos: grupo 1 - BAP, grupo 2 - TAP com doxiciclina (TAPd), grupo 3 - TAP com cefaclor (TAPc), grupo 4 - TAP com amoxicilina (TAPa), e grupo 5 - TAP com minociclina (TAPm) (n=10/ grupo). Os resultados mostraram que BAP, TAPd, e TAPm não alteraram os níveis de minerais. TAPa e TAPc aumentaram os níveis de cálcio e a razão cálcio/fósforo da dentina radicular, concluindo que tais medicações antibióticas influenciam positivamente o processo de revascularização.

1.3 Citotoxicidade das medicações antibióticas

Chuensombat et al. (2013) avaliaram a citotoxicidade e eficácia antibacteriana da pasta TAP e de cada componente antibiótico separadamente. Para o teste de citotoxicidade, células pulpares dentárias humanas e células da papila apical foram expostas às diferentes medicações usando concentrações de 0,024, 0,097, 0,39, 1,56, 6,25 e 25 mg/mL durante um, três, cinco e sete dias. A viabilidade celular foi determinada utilizando o 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-ensaio de brometo de difenil-tetrazólio (MTT). Para o teste antibacteriano, a pasta 3Mix ou um único antibiótico nas concentrações de 25mg/mL e 0,39 mg/mL foram testados em bactérias isoladas de dentes com polpas necróticas, sendo medido o crescimento bacteriano no meio ágar de sangue.. Os resultados mostraram que a concentração de 0,024 mg/mL de todos grupos experimentais proporcionou a maior viabilidade de células pulpares e de células da papila dental em todos os períodos de tempo. No sétimo dia, 0,39 mg/mL de TAP produziu mais de 90% de viabilidade celular. A TAP na concentração de 25 mg/mL foi capaz de eliminar completamente as bactérias coletadas de dentes com polpas necróticas, enquanto que na concentração de 0,39 mg/mL, apesar de ter sido incapaz de erradicar todas as bactérias, demonstrou uma redução bacteriana significativa em relação ao grupo controle.

Com exceção do metronidazol, a citotoxicidade aumentou de acordo com a concentração e tempo. Os autores concluíram que a pasta 3Mix na concentração de 0,39 mg/mL apresentou menor citotoxicidade e foi capaz de reduzir significativamente as bactérias.

Faria et al. (2018) estudaram a influência formulações de antibióticos na forma de comprimido/cápsula (TC), ou na forma pura (Farmacopéia dos Estados unidos) (USP) e veículos (água [H₂O] ou macrogol + propilenoglicol [MP]) sobre a citotoxicidade e o pH das TAPs. Fibroblastos L929 foram expostos as TAPs preparadas com antibióticos TC ou USP misturados à H₂O ou MP durante 72 horas. A citotoxicidade foi avaliada pelo teste MTT. As pastas preparadas com TC foram menos citotóxicas do que pastas preparadas com Antibióticos da classe USP e pastas com o veículo MP foram menos citotóxicas do que pastas com H₂O como veículo. O grupo TC TAP + MP apresentou a menor citotoxicidade, enquanto USP TAP + H₂O apresentou a maior citotoxicidade. Os autores concluíram que o veículo e as formulações antibióticas influenciaram a citotoxicidade e o pH da TAP. As pastas preparadas com TC e MP foram menos ácidas e menos citotóxicas do que às preparadas com antibióticos da classe USP e H₂O.

1.4 Medicções antibióticas x Células-tronco pulpares

Lovelace et al. (2011) avaliaram a capacidade dos RETs em desenvolver células-tronco no espaço do canal radicular de dentes imaturos em pacientes jovens. Análises moleculares do sangue coletado do SCR indicaram o acúmulo significativo de marcadores de células-tronco CD73 e CD105 (até 600 vezes), comparados com os níveis encontrados no sangue sistêmico. Os achados, coletivamente, demonstraram que a etapa de sangramento em procedimentos regenerativos desencadeia o acúmulo significativo de células-tronco indiferenciadas no espaço do canal onde essas células podem contribuir para a regeneração dos tecidos pulpares observados após a terapia com pasta antibiótica em dentes imaturos com necrose pulpar.

Ruparel et al. (2012) estudaram o efeito da TAP, contendo metronidazol, ciprofloxacina e minociclina na proporção de 1:1:1; BAP, contendo metronidazol e ciprofloxacina na proporção de 1:1; da TAP modificada contendo metronidazol, ciprofloxacina e cefaclor, na proporção de 1:1:1; e da Ca(OH)₂/Ultracal, em concentrações variando de 100 mg/mL a 0,01 mg/mL, sobre as células-tronco da papila apical. Os resultados

mostraram que quanto maior a concentração, maior a citotoxicidade e menor sobrevivência e proliferação celular.

Althumairy, Teixeira e Diogenes (2014) avaliaram o efeito do condicionamento dentinário com medicações intracanaís na sobrevivência das células tronco da papila dentária. As amostras de dentina foram expostas a TAP e DAP em diferentes concentrações e a Ca(OH)_2 . Os autores concluíram que TAP e BAP a 1000mg/mL resultaram em inviabilidade das células-tronco, enquanto na concentração de 1mg/mL não houve efeito adverso. Mostraram, ainda, que o uso de Ca(OH)_2 aumentou de maneira significativa a sobrevivência e proliferação dessas células.

Alghilan et al. (2017) estudaram a ligação e proliferação de células-tronco da polpa dentária (DPSC) em dentina tratada com diferentes protocolos endodônticos regenerativos. Os grupos teste foram tratados com concentrações clinicamente utilizadas de TAP, BAP, Ca(OH)_2 ou TAP diluído em metilcelulose (DTAP) por uma semana. Já os dois grupos controle foram tratados com ou com EDTA ou não receberam tratamento. Os resultados mostraram que a DTAP, bem como a dentina tratada com EDTA, causaram aumentos significativos na ligação DPSC à dentina. TAP, BAP e Ca(OH)_2 causaram reduções significativas na proliferação de DPSC na dentina. No entanto, o protocolo com DTAP não gerou efeitos negativos significativos na proliferação de DPSC.

1.5 Medicações antibióticas x Veículos

Takushige et al. (2004) avaliaram o desfecho clínico da LSTR no tratamento de 87 dentes decíduos de 56 pacientes, entre quatro e 18 anos. Foi utilizada uma mistura de metronidazol, ciprofloxacina e minociclina com macrogol e propilenoglicol (MP) ou com cimento endodôntico e os canais não foram preparados antes ou após a desinfecção. Os resultados mostraram que os sintomas clínicos como inchaço gengival, dor severa e espontânea desapareceram após o tratamento em todos os casos, embora em quatro casos os sintomas só tenham desaparecido após retratamento com o mesmo procedimento. Os autores concluíram que dentes decíduos com lesão perirradicular, com ou sem reabsorção radicular fisiológica, foram tratados com sucesso pela terapia LSTR.

Trope et al. (2008) descreveram o tratamento de um segundo pré-molar inferior com rizogênese incompleta e, sinais radiográficos e clínicos de periodontite apical com a presença

de fístula. O canal foi desinfectado sem instrumentação, mas com irrigação abundante com hipoclorito de sódio a 5,25% e o uso de uma mistura de ciprofloxacina, metronidazol e minociclina, com veículo propilenoglicol e macrogol (MP), sugerindo uma adaptação do protocolo de manipulação da pasta TAP para uso em duas consistências, 1:5 (MP:TAP) para consistência cremosa e 1:7 (mistura padrão).

Gomes-Filho et al. (2012) avaliaram a resposta do tecido subcutâneo de ratos a tubos de polietileno implantados preenchidos com TAP, Ca(OH)_2 , propilenoglicol e macrogol. Trinta ratos receberam dois implantes individuais de tubos de polietileno preenchidos com TAP ou pasta de Ca(OH)_2 e outro com tubo vazio como controle. Trinta ratos adicionais receberam dois implantes constituídos por tubos de polietileno com veículos (macrogol e propilenoglicol) e um controle. As medicações induziram reações moderadas aos sete e 15 dias, semelhantes ao controle e reduzido em intensidade (para suave) a partir do trigésimo dia. TAP e Ca(OH)_2 foram biocompatíveis nos diferentes períodos experimentais testados e os veículos não interferiram na reação às medicações.

Almeida (2018) avaliou o efeito de medicações antibióticas nas consistências pastosa e sólida (com o uso de macrogol) sobre o biofilme de *E. faecalis* formado em dentina humana e mensurou a alteração de coloração coronária, foram utilizados nesse estudo, setenta dentes, os quais foram divididos em dois grupos controle e seis grupos antibióticos. Em relação à ação antibacteriana das substâncias, os grupos de pasta triantibiótica (ciprofloxacina, metronidazol e minociclina) e biantibiótica, nas duas consistências, mostraram-se eficientes contra o biofilme *E. faecalis*. O grupo triantibiótico sólido mostrou, ainda, uma menor descoloração quando comparado ao grupo triantibiótico pastoso.

1.6 Concentração das medicações antibióticas

Arias et al. (2016) estudaram o efeito antibacteriano direto e indireto (residuais) de várias concentrações de TAP em um sistema de metilcelulose. A espécie *E. faecalis* foi cultivada em blocos de dentina esterilizada (n=60) sendo estes tratados com TAP em concentração clínica (1.000 mg/mL), TAP-metilcelulose em baixas concentrações (100, 10 e 1 mg/mL), pasta placebo ou 1,5% NaOCl (n=10, cada). Após a remoção das pastas foram realizados testes de ruptura de biofilme. Para análise do efeito indireto, 120 blocos de dentina foram pré-tratados de acordo com os mesmos grupos experimentais (n=20, cada), e após a

remoção das pastas com água destilada, seguida por EDTA 17%, os espécimes foram imersos em solução salina tamponada com fosfato por duas e quatro semanas (n=10, cada). Após esse período, o *E. faecalis* foi cultivado nos blocos de dentina e os testes de ruptura de biofilme foram realizados. O trabalho demonstrou que em relação ao efeito antibacteriano direto, todos os grupos de tratamento foram superiores ao grupo placebo na erradicação de biofilme, enquanto as pastas triantibióticas com concentração de 10mg/mL ou superior, apresentaram efeitos antibacterianos residuais. Os autores concluíram, portanto, que a TAP com concentração de 10 mg/mL ou superior podem ser usadas durante a terapia de regeneração endodôntica.

Sabrah et al. (2015) investigaram o efeito da pasta TAP e BAP, em diferentes diluições (0,125, 0,25, 0,5, 1 e 10 mg/mL), na sobrevivência das células indiferenciadas da polpa dentária humana (DPSCs) e determinaram o seu efeito antibacteriano contra biofilme de *E. faecalis*. O estudo concluiu que todas as diluições testadas tiveram efeito antibacteriano contra *E. faecalis*. Contudo, as pastas BAP e TAP na concentração 0,125 mg/mL mostraram um efeito antibacteriano significativo sem efeito citotóxico sobre os DPSCs.

1.7 Medicções antibióticas x Alteração da coloração dentária

Akçay et al. (2014) avaliaram por meio de um espectrofotômetro a descoloração provocada por pastas antibióticas contendo a mistura de metronidazol e ciprofloxacina com minociclina, doxiciclina, amoxicilina ou cefaclor. Os resultados mostraram que todas as pastas antibióticas, exceto a biantibiótica, induziram descoloração coronária.

Kahler e Rossi-Fedele (2016) realizaram uma revisão sistemática de casos clínicos publicados para determinar a incidência de descoloração relatada e examinar se houve alguma associação particular com qualquer material. Uma pesquisa PubMed foi realizada e foram identificados oitenta estudos com 379 dentes tratados. Os autores concluíram que o uso de pasta triantibiótica com minociclina como medicamento intracanal deve ser reconsiderado e que o $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ou a BAP com metronidazol e ciprofloxacina podem limitar a descoloração. O MTA também foi associado à descoloração.

Shokouhinejad et al. (2018) avaliaram o efeito do selamento das paredes da câmara pulpar com um agente de união dentinária (DBA) na prevenção de descoloração induzida por RETs. As mudanças de cor foram medidas em diferentes etapas e os resultados mostraram

que os espécimes em que as paredes dentinárias foram seladas com DBA tiveram uma descoloração coronal significativamente menor em cada etapa do tratamento regenerativo, usando diferentes cimentos endodônticos, sem, contudo, impedi-la. Os autores reforçaram a necessidade de se reavaliar os protocolos da TAP com minociclina.

Jagdale et al. (2018) compararam a descoloração coronária induzida por duas pastas triantibióticas, TAP1 - metronidazol, ciprofloxacina e cefaclor, TAP2 - metronidazol, ciprofloxacina e minociclina, quando usadas com materiais restauradores temporários com profundidades de dois e quatro milímetros no final de zero (utilizado como baseline), três, e seis semanas. Quarenta incisivos superiores permanentes foram utilizados no trabalho. As duas pastas produziram descoloração, porém a mesma foi reduzida com o aumento da espessura do restaurador temporário. Os resultados mostraram também uma maior descoloração com a TAP contendo minociclina.

AlSaeed et al. (2018) avaliaram, *in vitro*, o potencial de descoloração e a atividade antimicrobiana contra *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Streptococcus intermedius* e *E. faecalis* dos seguintes antibióticos: TAP, augmentin e tigeciclina. Os canais radiculares foram preenchidos com TAP, augmentin e tigeciclina em concentrações de 1 ou 0,1mg/mL em uma base de hidrogel degradável ou TAP puro a 1 g/mL por sete dias. A descoloração coronal foi avaliada por espectrofotômetro uma, duas e três semanas após o curativo. A TAP a 1 g/mL não apresentou crescimento bacteriano, mas causou a maior descoloração. Misturas de hidrogel com TAP, augmentin ou tigeciclina a 1 mg/mL reduziram significativamente o crescimento bacteriano e o número de amostras positivas quando comparadas com aquelas a 0,1 mg/mL, com descoloração mínima.

Poly et al. (2018) avaliaram a capacidade de dois materiais restauradores de passo único OptiBond All-In-One (OB) e RelyX U200 (U200) em evitar o escurecimento coronário provocado pelo uso de minociclina como medicação intracanal. Foram utilizados cento e vinte incisivos superiores, os quais foram divididos em quatro grupos (n=30), dois grupos com o material restaurador: OB e U200, e dois grupos controle, sem o restaurador, sendo um com pasta a base de minociclina (MIN) e o outro com solução salina (SL). A cor foi determinada utilizando-se um espectrofotômetro em cinco momentos, imediatamente após a aplicação dos materiais e aos sete, 14, 21 e 28 dias posteriores. Observou-se uma redução da luminosidade após a aplicação da pasta em todos os grupos e em todos os intervalos de tempo. Após 28 dias, o grupo MIN apresentou mais escurecimento que os grupos OB, U200 e SL. Pode-se concluir que o uso desses materiais restauradores pode minimizar o escurecimento da coroa dentária.

Santos et al. (2018) avaliaram através de uma revisão sistemática se materiais alternativos à TAP e MTA cinza poderiam evitar a descoloração dentária em dentes submetidos ao RET. De 1.122 estudos, 38 foram incluídos, sendo principalmente relatos de casos (76,3%). De um total de 189 dentes submetidos ao REP, cerca de 54% apresentaram algum grau de descoloração, a maioria causada por TAP, principalmente quando combinada com GMTA. Os autores apresentaram como resultado que o uso de materiais alternativos ao TAP e GMTA, como a pasta BAP ou pastas de Ca(OH)_2 e MTA branco ou Biodentine™, mostraram redução da ocorrência de descoloração dentária.

2 PROPOSIÇÃO

2.1 Objetivo geral

Avaliar, *ex vivo*, a desinfecção dentinária intratubular obtida após o emprego de medicações antibióticas utilizadas em técnicas regenerativas endodônticas, em diferentes formulações e consistências.

2.2 Objetivos específicos

1) Quantificar o grau de desinfecção proporcionado por medicações antibióticas em diferentes formulações, utilizadas em técnicas regenerativas endodônticas e da pasta de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ sobre o biofilme intratubular de *E. faecalis*, por meio de análise com MCVL.

2) Verificar o impacto de diferentes veículos na atividade antimicrobiana de medicações antibióticas utilizadas em técnicas regenerativas endodônticas sobre o biofilme intratubular de *E. faecalis*.

2.3 Hipóteses

Hipótese nula (H0): Não há diferença entre as medicações testadas, assim como dos veículos testados na eliminação de biofilme intratubular de *E. faecalis ex vivo*.

Hipóteses alternativas:

H1- Há diferença entre as medicações testadas na eliminação de biofilme intratubular de *E. faecalis ex vivo* mas não dos seus veículos.

H2- Há diferença entre diferentes veículos testados na eliminação de biofilme intratubular de *E. faecalis ex vivo* mas não das medicações.

H3- Há diferença tanto entre diferentes veículos testados quanto entre as medicações na eliminação de biofilme intratubular de *E. faecalis ex vivo*.

3 METODOLOGIA

3.1 Seleção dos espécimes

O presente estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto (CAAE: 18258819.9.0000.5259 / Número do parecer: 3.619.523). Foram obtidos 90 caninos superiores e/ou inferiores do Banco de Dentes Humanos da Faculdade de Odontologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (BDH-FOUERJ) e desses, 77 foram selecionados.

Duas tomadas radiográficas, nos sentidos buco-lingual (Figura 1A) e méso-distal (Figura 1B), foram realizadas para cada elemento dentário, utilizando-se o aparelho radiográfico Odontomax 70/7P (Odontomax, Astex, São Paulo, Brasil) e o sensor digital FONA CDRelite (Dentsply Sirona, Nova Iorque, EUA) a fim de serem selecionados apenas elementos dentários unirradiculares, com um único canal, sem reabsorções, calcificações, trincas ou cáries radiculares.

Figura 1- Radiografias periapicais realizadas para a seleção dos espécimes.



Legenda: (A) Radiografia no sentido buco-lingual; (B) Radiografia no sentido méso-distal.
Fonte: O autor, 2019.

3.2 Preparo das amostras

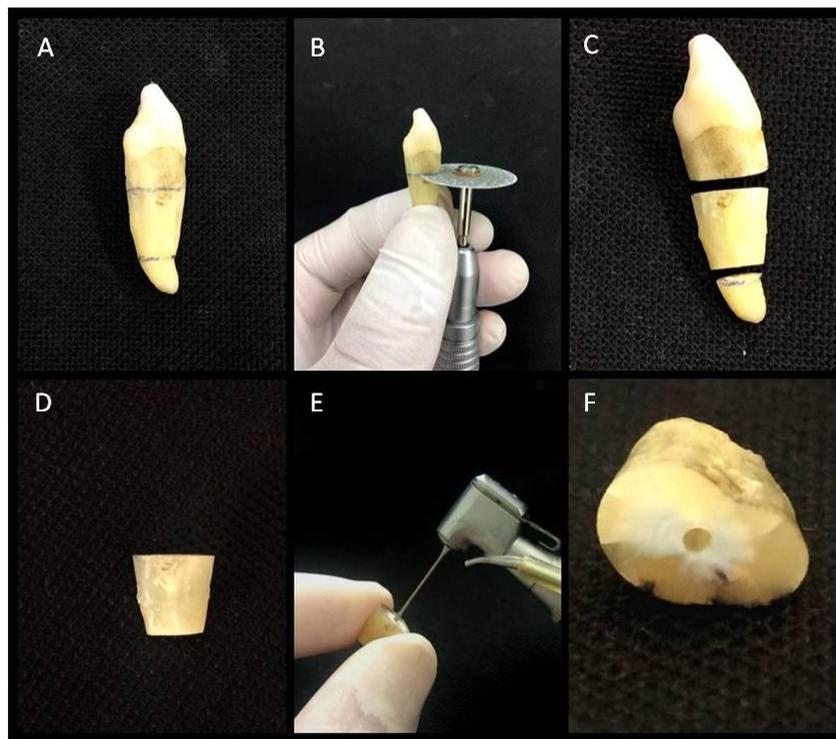
A metodologia do preparo das amostras foi baseada no modelo proposto por Haapasalo e Orstavik (1987) e Andrade et al. (2015) com modificações. Após a descontaminação inicial com NaOCl 1%, os dentes tiveram a coroa e o ápice seccionados,

utilizando-se um disco flexível diamantado Dupla Face 0,10 x 22 mm (KG Sorensen, Cotia, SP, Brasil) em baixa velocidade, para a obtenção de cilindros de dentina do terço médio do elemento dentário, com 8 mm de comprimento (Figura 2A-D). Além disso, o diâmetro interno dos canais radiculares foi ampliado por fresas de Gates Glidden 4, de 28mm de comprimento (Dentsply Maillefer®, Ballaigues, Suíça) (Figura 2E-F).

As amostras foram submetidas a banhos ultrassônicos, utilizando-se NaOCl 1%, EDTA 17% e solução salina, com duração de 10 min cada (Marinho et al., 2015) e então, esterilizadas em autoclave (Cristófoli, Campo Mourão, PR, Brasil) a 121 °C, por 24min.

Os espécimes foram divididos aleatoriamente entre os sete grupos de medicações testadas (n=10) mais um grupo controle (n=7).

Figura 2 – Preparo das amostras: confecção dos cilindros de dentina.



Legenda: (A) Marcação no espécime; (B) Corte com disco diamantado; (C) Espécime cortado; (D) Cilindro com 8mm; (E) Ampliação com fresas Gates Glidden; (F) Aspecto final do cilindro.

Fonte: O autor, 2019.

3.3 Preparo da cultura, inóculo e incubação

Os cilindros de dentina foram submetidos a um processo de contaminação intratubular baseado em Andrade et al. (2015). A cepa bacteriana de *E. faecalis* (ATCC 29212) (Figura 3A) foi obtida da *American Type culture collection* (Manassas, Virgínia, EUA), reativadas em um tubo contendo 3 mL de caldo BHI (Brain Heart Infusion, Difco, Detroit, MI, EUA) esterilizado (Figura 3B) e mantidas a 37°C por 24 h. Após esse período, 1 mL da cultura bacteriana foi transferida para um frasco contendo 50 mL de BHI (Figura 3C) e incubada por 24h para alcançar crescimento exponencial. A cultura foi ajustada para a escala No. 1 McFarland (3×10^8 UFC/mL) utilizando um espectrofotômetro (Bel Photonics do Brasil Ltda, Osasco, SP, Brasil) (Figura 3D e 3E). Todo o preparo da cultura e do inóculo foi realizado dentro da câmara de fluxo laminar do Laboratório de pesquisas da Endodontia - Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB-USP).

Por um período de cinco dias, foram realizadas, de forma asséptica em câmara de fluxo laminar, trocas periódicas de inóculo contaminado e de meio de cultura limpo, além de ciclos diferentes de centrifugações, da seguinte forma (ANDRADE et al., 2015):

- Dia 1: Após terem sido esterilizados, os espécimes foram inseridos em microtubos contendo 1 mL de meio de cultura BHI esterilizado e submetidos a banho ultrassônico por 15 minutos para penetração deste dentro dos túbulos dentinários. Posteriormente, a solução anterior foi descartada e inseridos 1 mL do inóculo preparado no dia anterior (Figura 3F). Os microtubos foram submetidos as seguintes velocidades de centrifugação: 1400, 2000, 3600 e 5600 g, durante 5 min a 25°C, duas vezes para cada velocidade na centrífuga (Eppendorf 5424R; Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) (Figura 3G-H). Entre cada centrifugação, o inóculo usado para penetrar nos túbulos dentinários foi descartado e substituído por 1 mL de novo inóculo padronizado. Após os oito ciclos de centrifugação, os microtubos receberam 1 mL de BHI esterilizado, foram centrifugados a 3600 g e incubados em uma estufa a 37° C por 24 h.

- Dia 2: O inóculo foi substituído por 1 mL de BHI esterilizado e então os microtubos foram submetidos a um ciclo de centrifugação a 3600 g por 5 min, sendo incubados novamente em estufa bacteriológica a 37°C por 24 h.

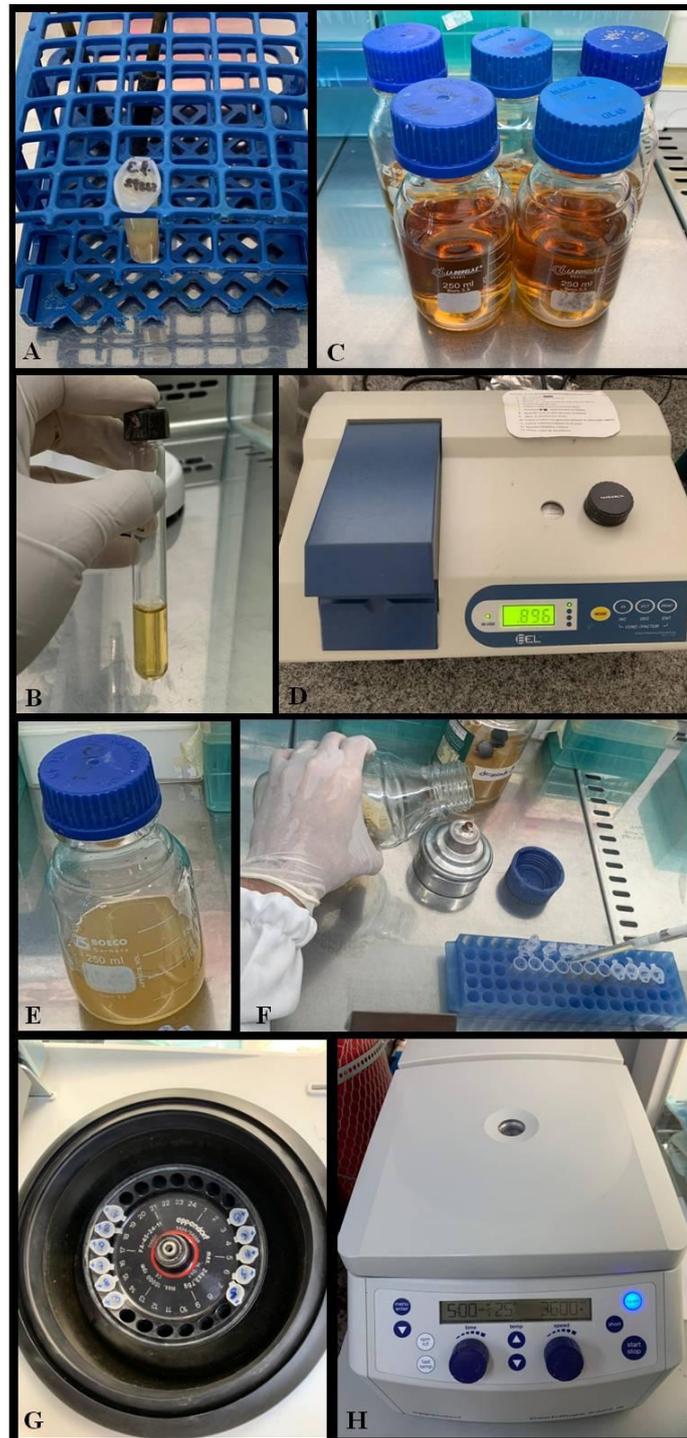
- Dia 3: A solução anterior foi descartada e inseridos 1 mL do inóculo preparado no dia anterior. Os microtubos foram submetidos as seguintes velocidades de centrifugação: 1400, 2000, 3600 e 5600 g, durante 5 min a 25°C, duas vezes para cada velocidade na centrífuga (Eppendorf 5424R). Entre cada centrifugação, o inóculo usado para penetrar nos túbulos

dentários foi descartado e substituído por mais 1 mL de novo inóculo. Após os oito ciclos de centrifugação, os microtubos receberam 1 mL de BHI esterilizado, foram centrifugados a 3600 g e incubados em uma estufa a 37° C por 24 h.

- Dia 4: O inóculo foi substituído por 1 mL de BHI esterilizado e então os microtubos foram submetidos a um ciclo de centrifugação a 3600 g por 5 min, sendo incubados novamente em estufa bacteriológica a 37°C por 24 h.

- Dia 5: Remoção do caldo de BHI e aplicação das medicações propostas.

Figura 3 - Preparo da cultura e contaminação dos espécimes.



Legenda: (A) cepa bacteriana de *E. faecalis* (ATCC 29212); (B) Tubo com 3 mL de BHI esterilizado para reativação da cepa bacteriana de *E. faecalis*; (C) Frascos de BHI esterilizado; (D) Espectrofotômetro (Bel Photonics do Brasil Ltda, Osasco, SP, Brasil); (E) Suspensão bacteriana de 3×10^8 células mL⁻¹; (F) colocação do inóculo padronizado nos microtubos contendo os espécimes; (G) Microtubos dispostos na centrífuga Eppendorf 5424R; (H) Centrífuga ajustada para o ciclo na velocidade de 3600g, por 5 min, temperatura 25°C.
 Fonte: O autor, 2019.

3.4 Preparo e aplicação das medicações

Foram testados seis grupos de medicações antibióticas (n=10), variando-se princípios ativos (Figura 4A-G) e veículos (Figura 4H-I), um grupo com Ca(OH)₂ (n=10), e um grupo controle positivo (n=7), como mostrado a seguir:

- Grupo TAP/MP: medicação triantibiótica (ciprofloxacina, metronidazol e minociclina); veículos: propilenoglicol e macrogol;
- Grupo TAP/MPmod: medicação triantibiótica (ciprofloxacina, metronidazol e clindamicina); em veículos: propilenoglicol e macrogol;
- Grupo BAP/MP: medicação biantibiótica (ciprofloxacina e metronidazol); veículos: propilenoglicol e macrogol;
- Grupo TAP: medicação triantibiótica (ciprofloxacina, metronidazol e minociclina); veículo: propilenoglicol;
- Grupo TAPmod: medicação triantibiótica (ciprofloxacina, metronidazol e clindamicina); veículo: propilenoglicol;
- Grupo BAP: medicação bi antibiótica (ciprofloxacina e metronidazol); veículo: propilenoglicol;
- Grupo HC: pasta de Ca(OH)₂; veículo: propilenoglicol;
- Grupo CP: controle positivo, que recebeu todo o tratamento prévio, foi contaminado, porém, não recebeu medicação.

Para a formação do Grupo CP (n=7), as 77 amostras foram divididas em sete grupos experimentais (n=11), separando-se um espécime de cada grupo para constituir o espécime controle, para que, apesar de não receber medicação, pudesse ser incubado em estufa junto aos demais por 14 dias.

As medicações triantibióticas (Farmácia Santa Paula, Araraquara, SP, Brasil) foram preparadas numa proporção de 1:1:1 dos antibióticos (1,66 mg cada, totalizando 5 mg), já no grupo das medicações biantibióticas, a proporção foi de 1:1 (2,5 mg de cada, totalizando 5 mg), de forma que atingissem, quando em consistência fluida, uma concentração de 5mg/mL, baseado nas recomendações da *American Association of Endodontics* em 2018 (<https://www.aae.org>).

A quantidade de pó utilizada foi determinada por uma balança analítica digital (Ohaus Adventurer AR2140, Nova Jersey, EUA) (Figura 5A-C).

Antes de serem misturados aos veículos, o pó das medicações antibióticas foi macerado com um pistilo por três minutos, metodologia baseada em *LSTR 3Mix-MP Therapy* (<http://www.lstr.jp/e/information.html>) (Figura 5D-F).

As medicações em que foram utilizados propilenoglicol e macrogol como veículo, ficaram com consistência sólida e foram inseridas no canal com o auxílio de calcadores de Paiva (Golgran Indústria e Comércio de Instrumental Odontológico Ltda., São Caetano do Sul, SP, Brasil) (Figura 5G-I). Uma concentração de 1000 mg/mL é necessária para esse tipo de consistência similar a usada na clínica (RUPAREL et al., 2012).

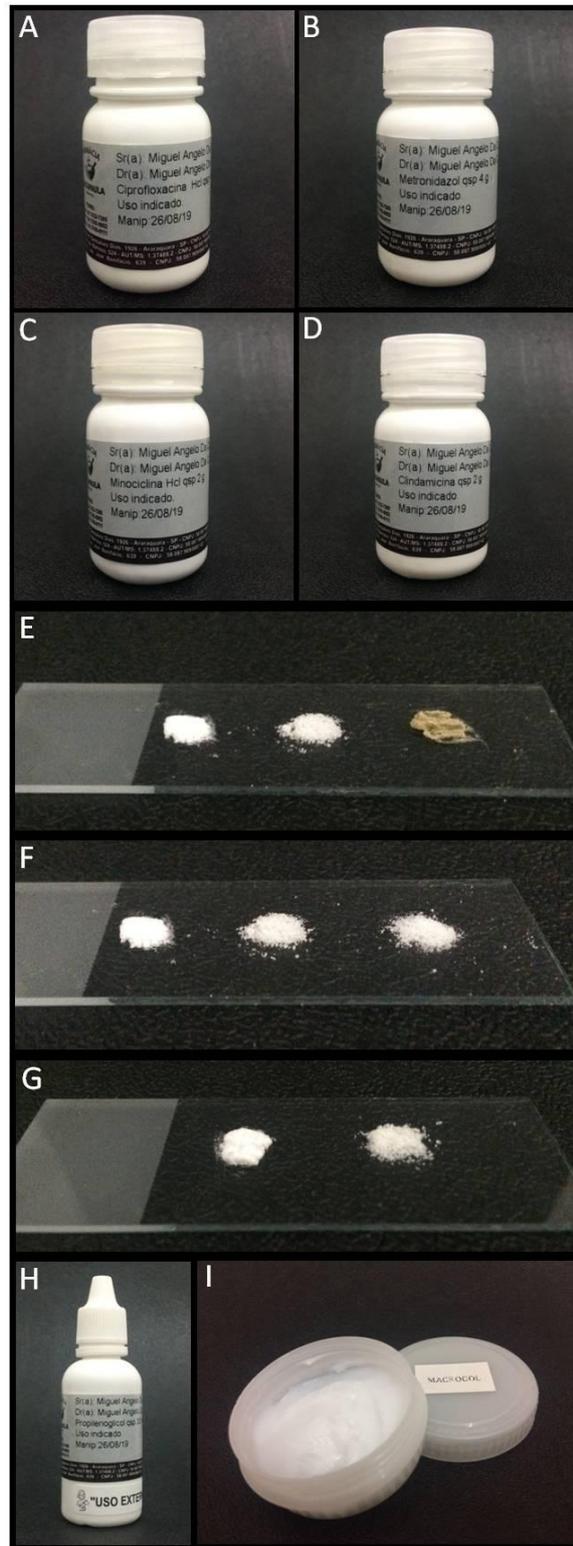
As medicações antibióticas que utilizaram somente o propilenoglicol como veículo, ficaram com consistência fluida, (Figura 6A-C) numa concentração de 5mg/mL, sendo inseridas dentro do canal com uma seringa hipodérmica 1 ml (100 U.I.) com agulha 30G 5/16" (8 x 0,30mm) (Solidor, Osasco, SP, Brasil) (Figura 6D-F).

A pasta de hidróxido de cálcio foi utilizada numa proporção de 3:1 (pó/propilenoglicol) de acordo com Pereira et al. (2018) e foram inseridas no canal com auxílio de uma lima K 10 (Dentsply Maillefer®, Ballaigues, Suíça).

Para a aplicação da medicação, os cilindros foram removidos dos microtubos e fixados em uma mesa metálica esterilizada (Figura 7A).

Após a aplicação das medicações (Figura 7B), os cilindros tiveram uma das extremidades seladas com obturador provisório Coltosol® (Coltene, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), foram acomodados em uma placa de Petri forrada com gaze estéril umidificada com 5 ml de solução estéril (Figura 7C-D) e mantidos por 14 dias em estufa a 37°C, período de acordo com as recomendações da AAE em 2018 (<https://www.aae.org>).

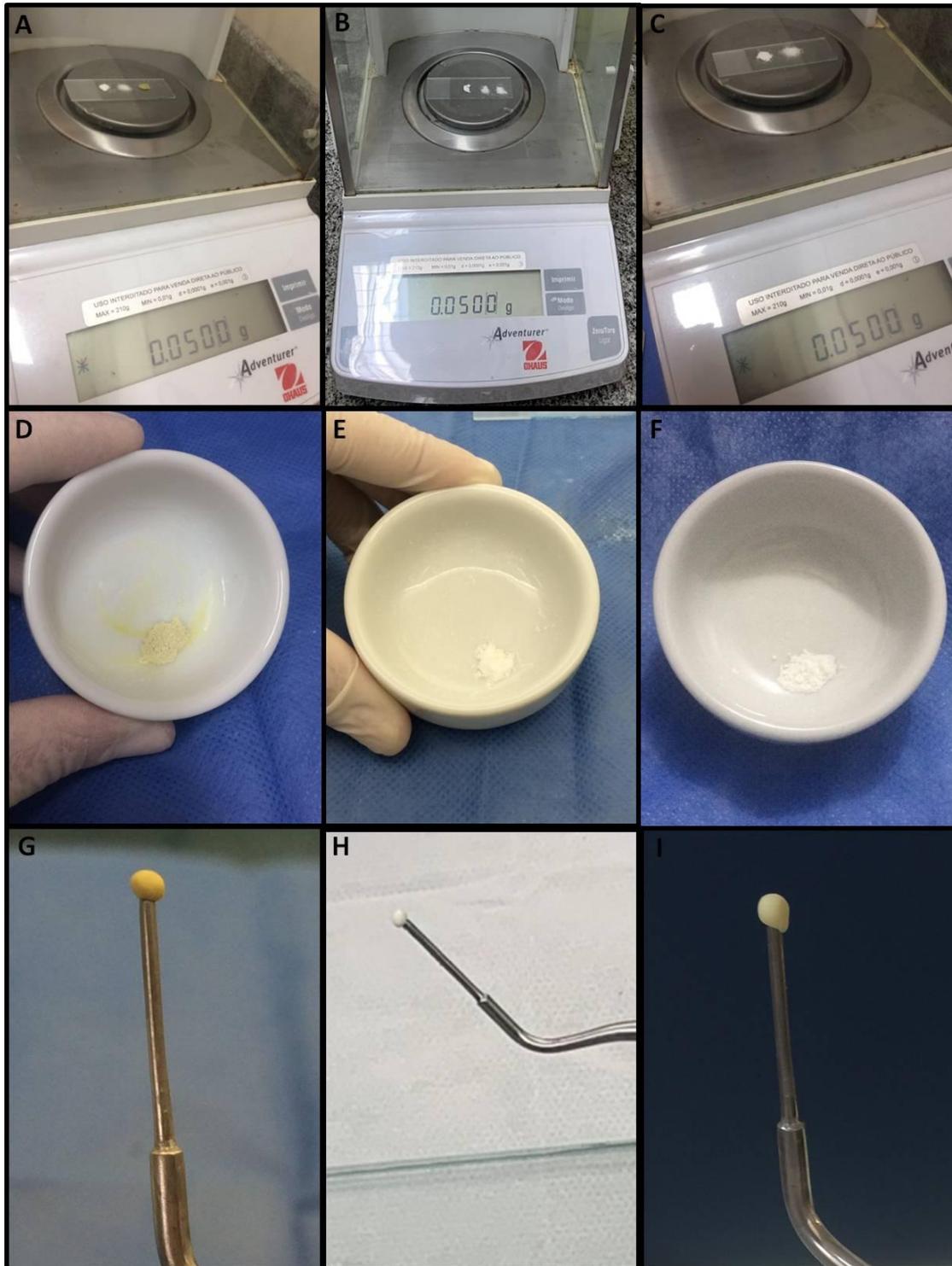
Figura 4 - Medicações antibióticas, pó das combinações e veículos.



Legenda: (A) Ciprofloxacina; (B) Metronidazol; (C) Minociclina; (D) Clindamicina; (E) Pós da pasta triantibiótica: Ciprofloxacina, metronidazol e minociclina; (F) Pós da pasta triantibiótica modificada: Ciprofloxacina, metronidazol e clindamicina; (G) Pós da pasta biantibiótica: Ciprofloxacina e metronidazol; (H) Propilenoglicol; (I) Macrogol.

Fonte: O autor, 2019.

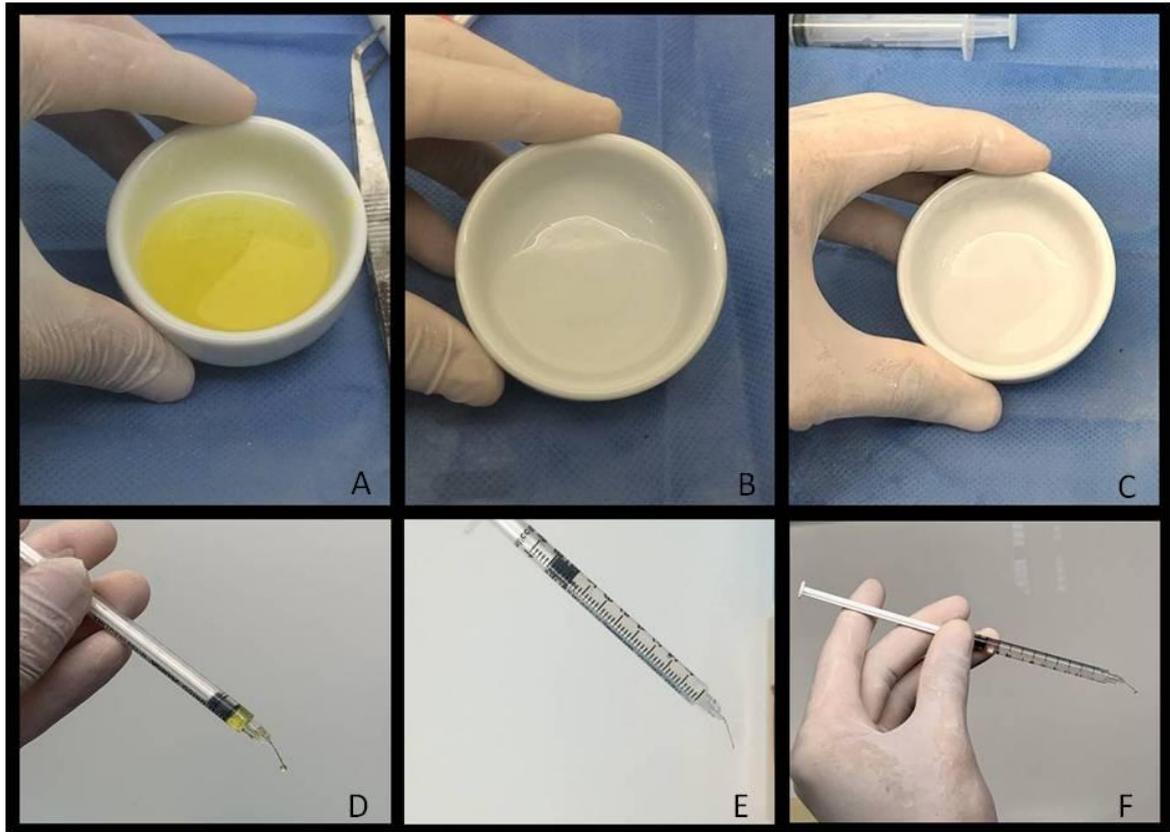
Figura 5 - Preparo das medicações na consistência sólida.



Legenda: (A) – Pesagem: ciprofloxacina, metronidazol e minociclina, para dez elementos; (B) Pesagem: ciprofloxacina, metronidazol e clindamicina, para dez elementos; (C) – Pesagem: ciprofloxacina e metronidazol, para dez elementos; (D), (E) e (F) Pós macerados e homogeneizados; (G) Consistência da TAP/MP; (H) Consistência da TAP/MPmod; (I) Consistência da BAP/MP;

Fonte: O autor, 2019.

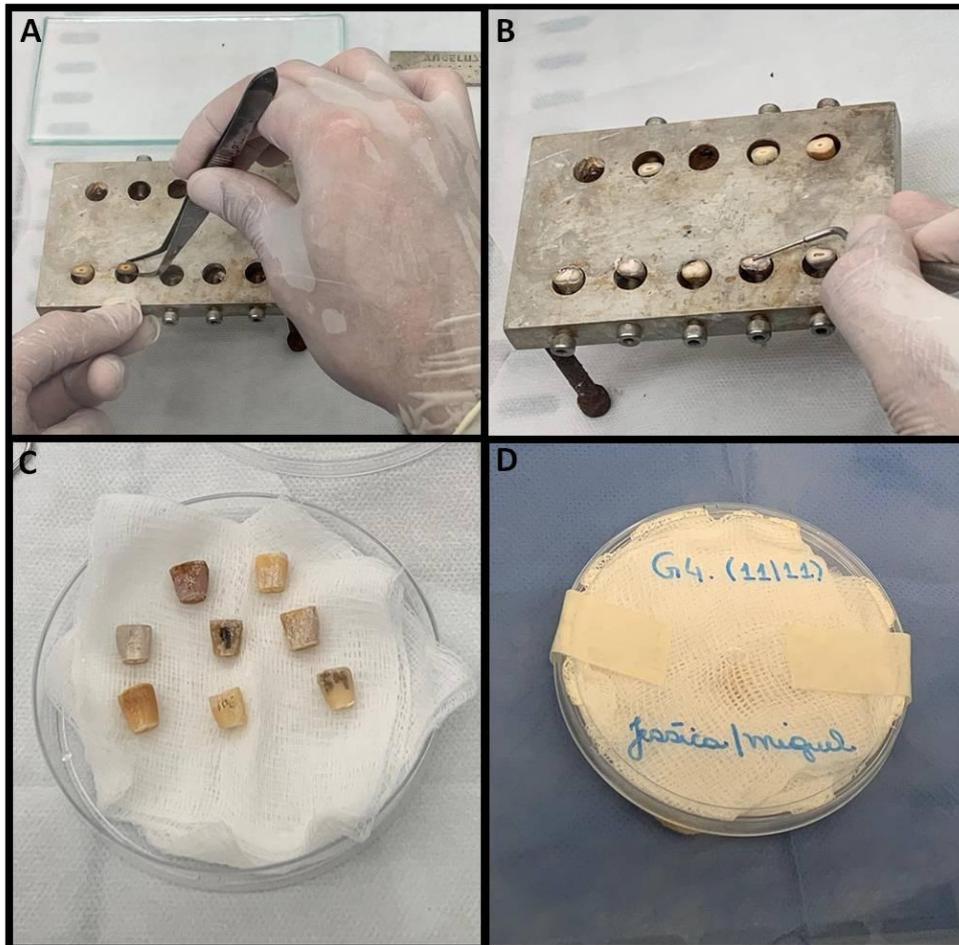
Figura 6 - Medicções antibióticas em consistência fluida.



Legenda: (A) Mistura da pasta triantibiótica -TAP; (B) Mistura da pasta triantibiótica modificada - TAPmod ; (C) Mistura da pasta biantibiótica – BAP. (D), (E) e (F) Medicções nas seringas hipodérmicas para aplicação nos cilindros.

Fonte: O autor, 2019.

Figura 7 - Montagem dos espécimes para aplicação da medicação sólida e para manutenção na estufa por 14 dias.



Legenda: (A) – Espécime sendo posicionado na mesa metálica esterilizada; (B) Aplicação da medicação sólida; (C) Disposição dos espécimes na placa de Petri; (D) Placa identificada para o armazenamento na estufa; Fonte: O autor, 2019

3.5 Preparo para MCVL

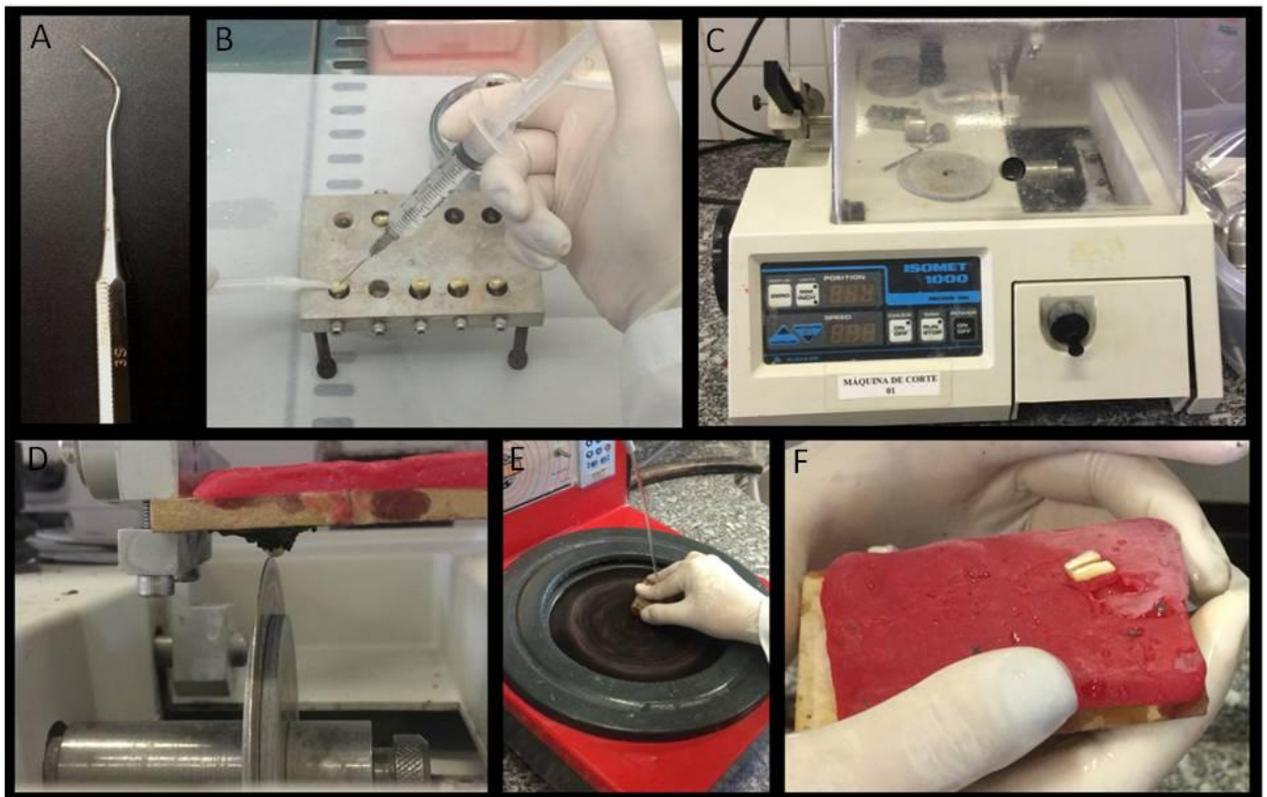
Após o período de 14 dias em estufa, os espécimes foram novamente fixados na mesa metálica esterilizada, tiveram o selador temporário da embocadura removido com Esculpidor Holleback 3S (SSWhite Duflex, Juiz de Fora, MG, Brasil) (Figura 8A) e as medicações removidas por meio de irrigação com 5ml de água destilada esterilizada (Figura 8B).

Os cilindros foram seccionados longitudinalmente usando uma cortadora de precisão de baixa velocidade Isomet™ (Buehler, Lake Bluff, UT, EUA) obtendo-se duas metades (Figura 8C-D). Uma das metades foi selecionada e teve a superfície regularizada por meio de

uma Politriz Lixadeira Metalográfica de Velocidade Variável “PLF DV” (Fortel, São Paulo, SP, Brasil) (Figura 8E-F).

Os espécimes foram lavados com água destilada, mantidos em EDTA 17% (Biodinâmica, Iporã, PR, Brasil) por 3 min (Figura 9A), lavados novamente com água destilada (Figura 9B), secos em papel absorvente (Figura 9C) e então corados com 20 μ L de SYTO9/Propidium Iodide dye (LIVE/DEAD®BacLight® Bacterial Viability Kit, Invitrogen Molecular Probes, Eugene, OR, EUA) (Figura 9D) por 15 minutos em ambiente escuro. Esse kit consiste num corante verde SYTO®9 para corar bactérias vivas, e um corante vermelho, iodeto de propídio, para corar bactérias mortas. Após esse período, as amostras foram dispostas numa lâmina com óleo de imersão (Figura 9E-F) e levadas para análise. As imagens da superfície do espécime foram obtidas utilizando-se lentes de aumento de 40x, 23 secções com 1 μ m de profundidade, formato de 1024 x 1024, de acordo com Andrade et al. (2015).

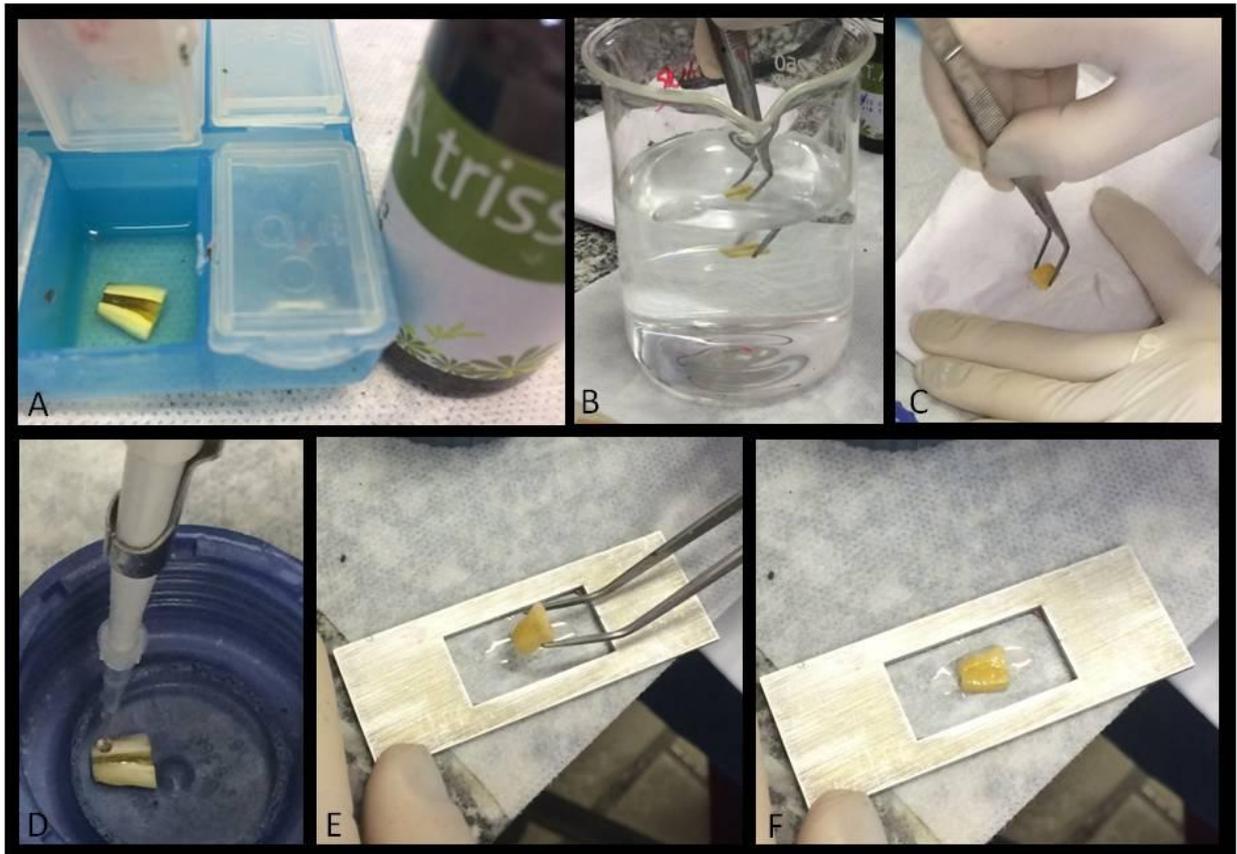
Figura 8 - Preparo dos espécimes para análise por MCVL.



Legenda: (A) Espátula Holleback para a remoção do selador temporário; (B) Irrigação com água destilada; (C) Isomet™; (D) Corte longitudinal do cilindro; (E) Planificação da superfície, Politriz Lixadeira; (F) Verificação da regularidade do espécime.

Fonte: O autor, 2019.

Figura 9 - Montagem dos espécimes para análise por MCVL.



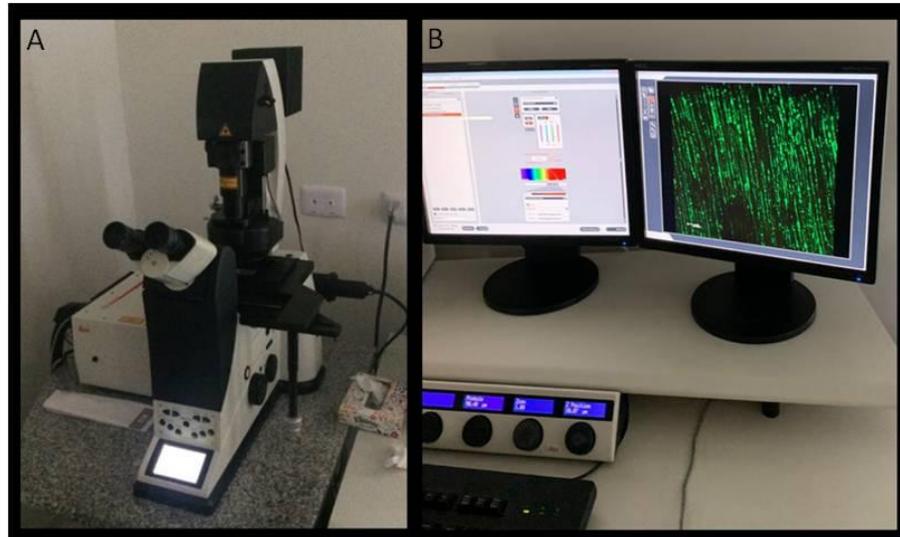
Legenda: (A) Aplicação de EDTA por 3min; (B) Lavagem em água destilada; (C) Secagem; (D) Aplicação do corante SYTO9/Propidium Iodide dye; (E) e (F) Disposição da amostra na lâmina.
Fonte: O autor, 2019.

3.6 Análise por MCVL

Após terem sido coradas, as amostras foram analisadas por MCVL (Figura 10A), utilizando-se lentes de aumento 40x. Para análise dos túbulos dentinários, foram obtidas oito imagens sequenciais, quatro no terço cervical e quatro no terço apical de cada cilindro dentinário. Em cada terço, duas imagens foram obtidas perto do canal (área superficial) e duas imagens distantes do canal (área profunda) (Figura 11), totalizando oitenta imagens por cada grupo de medicação. As imagens obtidas no MCVL foram convertidas por meio do Leica Software Application Suite-Advanced Fluorescence (Mannheim, Baden-Württemberg, Alemanha) (Figura 10B) e processadas no *software* BioImageLTM v21 software

(www.bioImageL.com), para quantificação da porcentagem de bactérias viáveis (verde) e não viáveis (vermelho) (ARIAS et al., 2016).

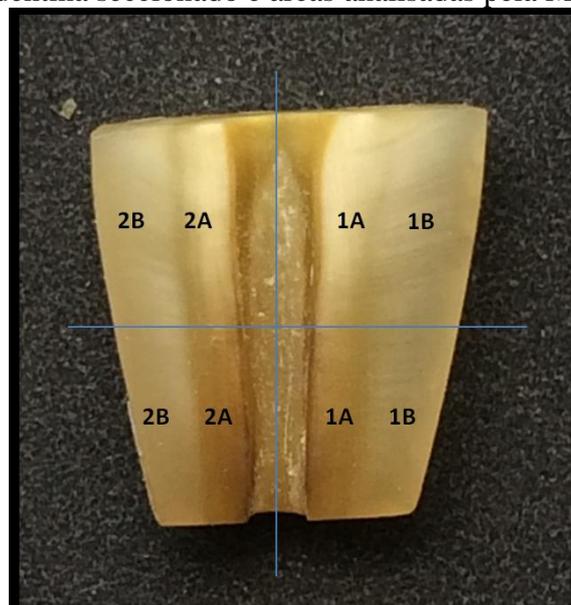
Figura 10 – MCVL.



Legenda: (A) Microscópio confocal de varredura a laser Leica TCS-SPE, (B) Imagem do Leica Application Suite-Advanced Fluorescence software (LAS AF, Leica, Mannheim, Baden-Württemberg, Alemanha) para obtenção das imagens e quantificação da fluorescência correspondente ao biofilme intratubular (verde - células viáveis e vermelha - células não viáveis)

Fonte: O autor, 2019.

Figura 11 - Cilindro de dentina seccionado e áreas analisadas pela MCVL.



Legenda: Microscopia: A- Superficial; B - Profundo; 1 e 2 representam os lados analisados.

Fonte: O autor, 2019.

3.7 Análise estatística

O teste Shapiro-Wilk para avaliação da normalidade revelou a ausência de distribuição normal nas análises do experimento ($p < 0,05$), portanto, foi realizado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn para comparação entre os grupos. O nível de significância foi estabelecido em 5%. O software utilizado foi o Prisma 8.3 (GraphPAD Software Inc, La Jolla, California).

4 RESULTADOS

4.1 Viabilidade total

As porcentagens totais de células viáveis, no biofilme intratubular de *E. faecalis* após terem sido colocados em contato com as medicações por 14 dias, estão apresentadas na tabela 1 e ilustradas pelo gráfico 1.

Os grupos TAP/MPmod, TAP/MP apresentaram atividade antimicrobiana superior a todos os grupos experimentais ($p < 0,05$), com exceção dos grupos TAPmod e BAP que apresentaram resultados estatisticamente semelhantes ($p > 0,05$). A viabilidade bacteriana pode ser observada na figura 12, por meio de imagens obtidas a partir do MCVL e pela reconstrução tridimensional na figura 13.

O grupo TAP, além de desempenho semelhante ao grupo HC, apresentou significativa ação antimicrobiana em relação ao grupo CP ($p < 0,05$).

O grupo BAP/MP teve o desempenho mais baixo entre os grupos testados, possuindo seus valores de descontaminação intratubular superiores apenas ao grupo CP, embora sem diferença estatística ($p > 0,05$).

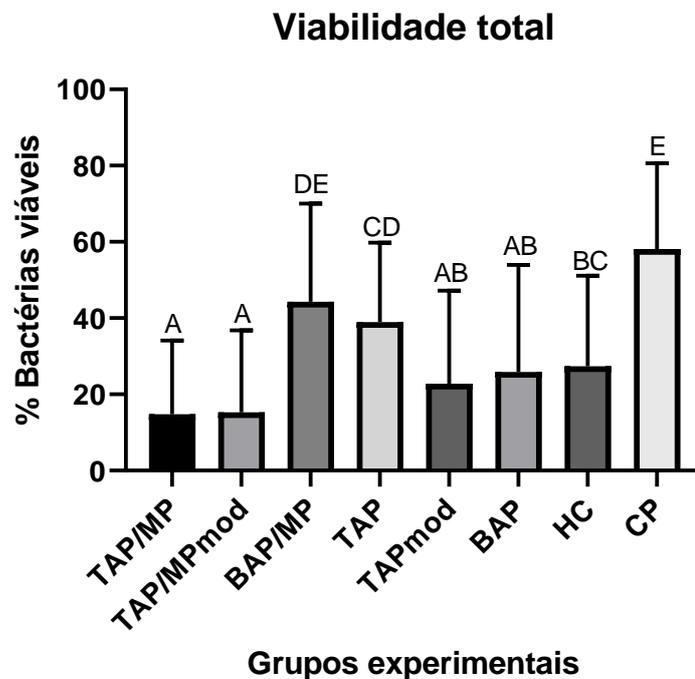
O grupo HC não apresentou diferença significativa quando comparado aos grupos TAP, TAPmod e BAP ($p > 0,05$), comportando-se de forma semelhante na descontaminação intratubular. Comparando-se o grupo HC aos grupos BAP/MP e CP o mesmo apresentou ação antimicrobiana significativamente superior ($p > 0,05$). Já em relação aos grupos TAP/MP e TAP/MPmod, apresentou uma ação antimicrobiana significativamente inferior ($p < 0,05$).

Tabela 1 – Valores da Mediana (med) e, mínimo e máximo (min-max) da porcentagem de células vivas do biofilme de *E. faecalis* em cada um dos grupos experimentais, após contato com as medicações por 14 dias.

Grupos experimentais	% Total de bactérias viáveis
TAP/MP	7.60 (0.0 – 91.40) ^A
TAP/MPmod	2.80 (0.0 – 87.30) ^A
BAP/MP	49.80 (0.0 – 97.10) ^{DE}
TAP	40.30 (0.0 – 81.60) ^{CD}
TAPmod	14.45 (0.0 – 100) ^{AB}
BAP	18.85 (0.0 – 100) ^{AB}
HC	26.80 (0.0 – 98) ^{BC}
CP	56.20 (14.30 – 100) ^E

Legenda: Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre os grupos experimentais ($p < 0,05$).

Gráfico 1 - Porcentagem de bactérias viáveis para cada grupo experimental.



Legenda: Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os grupos experimentais ($p < 0,05$). Traços verticais representam o desvio padrão.

4.2 Viabilidade por regiões

4.2.1 Região cervical

As porcentagens de células viáveis, no biofilme intratubular de *E. faecalis* do terço cervical, após terem sido colocados em contato com as medicações por 14 dias, estão apresentadas na tabela 2 e ilustradas pelo gráfico 2.

Os grupos TAP/MPmod, TAP/MP, BAP e HC apresentaram atividade antimicrobiana estatisticamente semelhante entre si ($p > 0,05$).

Os grupos BAP/MP e TAP, não apresentaram diferença significativa quando comparados aos grupos HC e BAP ($p > 0,05$), comportando-se de maneira similar na descontaminação intratubular.

O grupo HC comportou-se de forma semelhante aos demais grupos de medicações testadas, sem diferença significativa ($p > 0,05$).

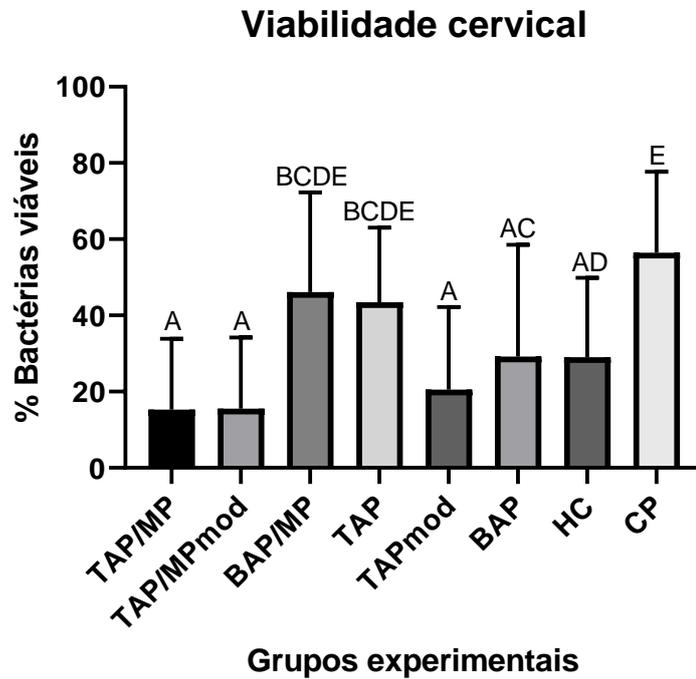
Todos os grupos, com exceção dos grupos TAP e BAP/MP, apresentaram diferença significativa em relação ao grupo CP ($p < 0,05$).

Tabela 2 – Valores da Mediana (med) e, mínimo e máximo (min-max) da porcentagem de células vivas do biofilme de *E. faecalis* da região cervical em cada um dos grupos experimentais, após contato com as medicações por 14 dias.

Grupos experimentais	% Bactérias viáveis na região cervical
TAP/MP	11.65 (0.0 – 75) ^A
TAP/MPmod	8.55 (0.0 – 63.70) ^A
BAP/MP	50.10 (0.0 – 93.60) ^{BCDE}
TAP	44.80 (0.0 – 80.40) ^{BCDE}
TAPmod	12.90 (0.0 – 100) ^A
BAP	21.35 (0.0 – 99.90) ^{AC}
HC	29.20 (0.0 – 73) ^{AD}
CP	55.60 (14.0 – 100) ^E

Legenda: Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre os grupos experimentais ($p < 0,05$).

Gráfico 2 - Porcentagem de bactérias viáveis na região cervical para cada grupo experimental.



Legenda: Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os grupos experimentais ($p < 0,05$). Traços verticais representam o desvio padrão.

4.2.2 Região apical

As porcentagens de células viáveis, no biofilme intratubular de *E. faecalis* da região apical, após terem sido colocados em contato com as medicações por 14 dias, estão apresentadas na tabela 3 e ilustrados pelo gráfico 3.

Os grupos TAP/MPmod, TAP/MP, TAPmod, BAP e HC apresentaram atividade antimicrobiana estatisticamente semelhante entre si ($p > 0,05$).

O grupo TAP não apresentou diferença significativa quando comparado aos grupos TAPmod, BAP, HC e BAP/MP ($p > 0,05$).

O grupo HC comportou-se de forma semelhante aos demais grupos de medicações testadas, sem diferença significativa ($p > 0,05$).

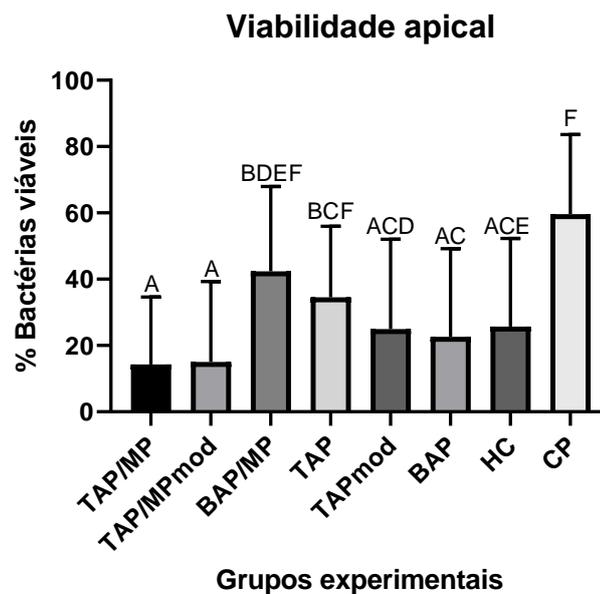
Todos os grupos, com exceção dos grupos TAP e BAP/MP, apresentaram diferença significativa em relação ao grupo CP ($p < 0,05$).

Tabela 3 – Valores da Mediana (med), mínimo e máximo (min-max) da porcentagem de células vivas do biofilme de *E. faecalis* da região apical em cada um dos grupos experimentais, após contato com as medicações por 14 dias.

Grupos experimentais	% Bactérias viáveis na região apical
TAP/MP	4.90 (0.0 – 91.40) ^A
TAP/MPmod	0.90 (0.0 – 87.30) ^A
BAP/MP	49.50 (0.0 – 97.10) ^{BDEF}
TAP	35.40 (0.10 – 81.60) ^{BCF}
TAPmod	18.20 (0.0 – 94.70) ^{ACD}
BAP	16.15 (0.0 – 100) ^{AC}
HC	16.50 (0.0 – 98) ^{ACE}
CP	56.30 (22 – 99.80) ^F

Legenda: Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre os grupos experimentais ($p < 0,05$).

Gráfico 3 - Porcentagem de bactérias viáveis na região apical para cada grupo experimental.



Legenda: Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os grupos experimentais ($p < 0,05$). Traços verticais representam o desvio padrão.

4.3 Viabilidade por profundidade

4.3.1 Superficial

As porcentagens de células viáveis, no biofilme intratubular de *E. faecalis* da região mais superficial, após terem sido colocados em contato com as medicações por 14 dias, estão apresentadas na tabela 4 e ilustradas pelo gráfico 4.

Os grupos TAP/MP, TAP/MPmod, BAP e TAPmod apresentaram atividade antimicrobiana estatisticamente semelhante entre si ($p > 0,05$).

O grupo TAP apresentou atividade antibacteriana semelhante em relação aos grupos BAP, TAPmod, HC e BAP/MP ($p > 0,05$). Porém, em relação aos grupos TAP/MP e TAP/MPmod, apresentou uma atividade antibacteriana inferior ($p < 0,05$).

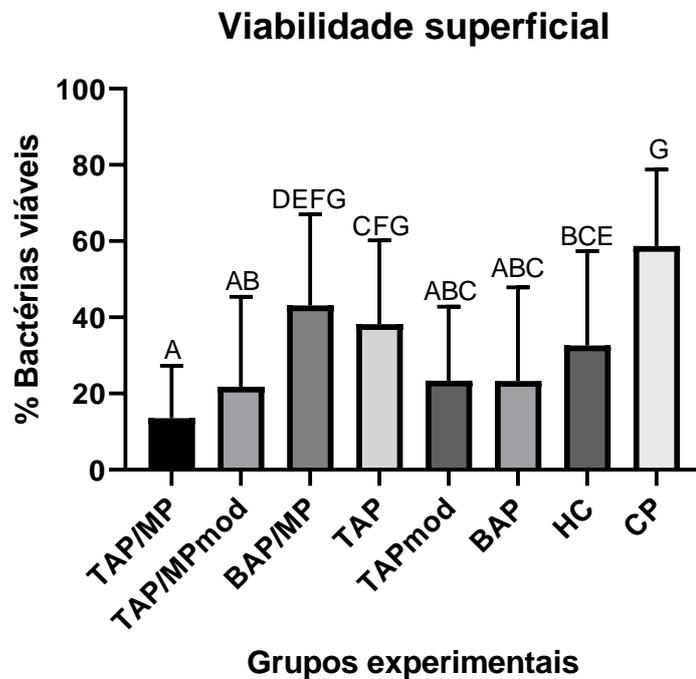
O grupo HC apresentou atividade antibacteriana similar aos grupos testados, exceto ao grupo TAP/MP, que eliminou de forma significativa mais bactérias da região superficial ($p < 0,05$).

Tabela 4 - Valores da Mediana (med), mínimo e máximo (min-max) da porcentagem de células vivas do biofilme de *E. faecalis* da região mais superficial em cada um dos grupos experimentais, após contato com as medicações por 14 dias

Grupos experimentais	% Bactérias viáveis superficialmente
TAP/MP	9.45 (0.0 – 51.40) ^A
TAP/MPmod	12.45 (0.0 – 87.30) ^{AB}
BAP/MP	46.30 (0.0 – 97.10) ^{DEFG}
TAP	40.30 (0.10 – 80.40) ^{CFG}
TAPmod	21.0 (0.0 – 69.90) ^{ABC}
BAP	17.55 (0.0 – 87.60) ^{ABC}
HC	16.50 (0.0 – 98) ^{BCE}
CP	55.75 (19.40 – 100) ^G

Legenda: Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre os grupos experimentais ($p < 0,05$).

Gráfico 4 - Porcentagem de bactérias viáveis na região mais superficial para cada grupo experimental.



Legenda: Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os grupos experimentais ($p < 0,05$). Traços verticais representam o desvio padrão.

4.3.2 Profunda

A porcentagem de células viáveis, no biofilme intratubular de *E. faecalis* da região mais profunda, após terem sido colocados em contato com as medicações por 14 dias, estão apresentados na tabela 5 e ilustrados pelo gráfico 5.

Os grupos TAP/MP, TAP/MPmod e TAPmod apresentaram atividade antimicrobiana estatisticamente semelhante entre si ($p > 0,05$).

O grupo TAP apresentou atividade antibacteriana inferior aos grupos TAP/MPmod e TAP/MP ($p < 0,05$) e semelhante aos demais grupos testados ($p > 0,05$).

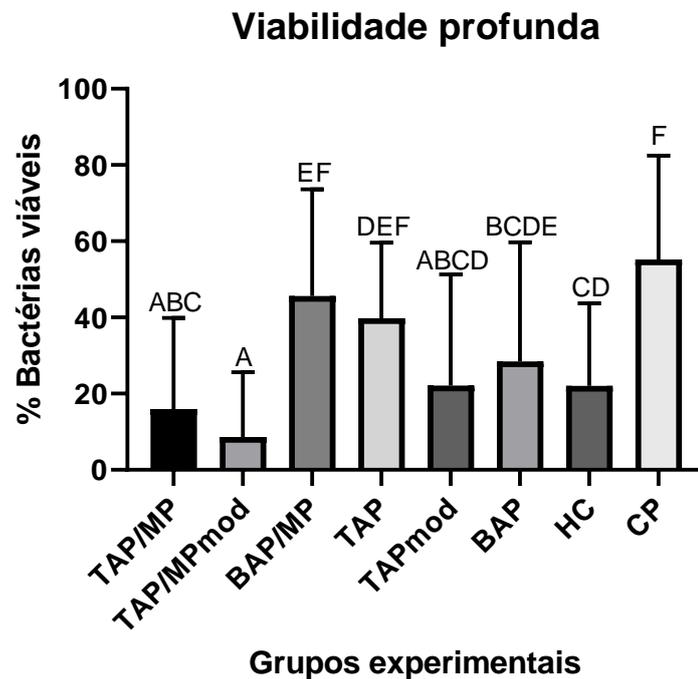
O grupo HC apresentou desempenho inferior ao grupo TAP/MPmod ($p < 0,05$), superior aos grupos BAP/MP e CP ($p < 0,05$) e semelhante aos demais ($p > 0,05$).

Tabela 5 - Valores da Mediana (med) e, mínimo e máximo (min-max) da porcentagem de células vivas do biofilme de *E. faecalis* da região mais profunda em cada um dos grupos experimentais, após contato com as medicações por 14 dias.

Grupos experimentais	% Bactérias viáveis profundamente
TAP/MP	0.35 (0.0 – 91.40) ^{ABC}
TAP/MPmod	0.0 (0.0 – 63.70) ^A
BAP/MP	51.60 (0.0 – 93.60) ^{EF}
TAP	40.75 (0.10 – 81.60) ^{DEF}
TAPmod	6.55 (0.0 – 100) ^{ABCD}
BAP	20.75 (0.0 – 100) ^{BCDE}
HC	21.0 (0.0 – 86.30) ^{CD}
CP	57.70 (0.0 – 99.80) ^F

Legenda: Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre os grupos experimentais ($p < 0,05$).

Gráfico 5 - Porcentagem de bactérias viáveis na região mais profunda para cada grupo experimental.



Legenda: Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os grupos experimentais ($p < 0,05$). Traços verticais representam o desvio padrão.

4. 4 Viabilidade por consistência

4.4.1 Consistência sólida

As porcentagens de células viáveis, no biofilme intratubular de *E. faecalis*, após terem sido colocados em contato por 14 dias, com as medicações antibióticas que tiveram como veículo macrogol e propilenoglicol, apresentando consistência sólida, além dos grupos HC, que serviu como um padrão de comparação, e CP, estão apresentadas na tabela 6 e ilustradas pelo gráfico 6.

TAP/MP e TAP/MPmod apresentaram atividade antimicrobiana superior aos demais grupos ($p < 0,05$) e estatisticamente semelhante entre si ($p > 0,05$).

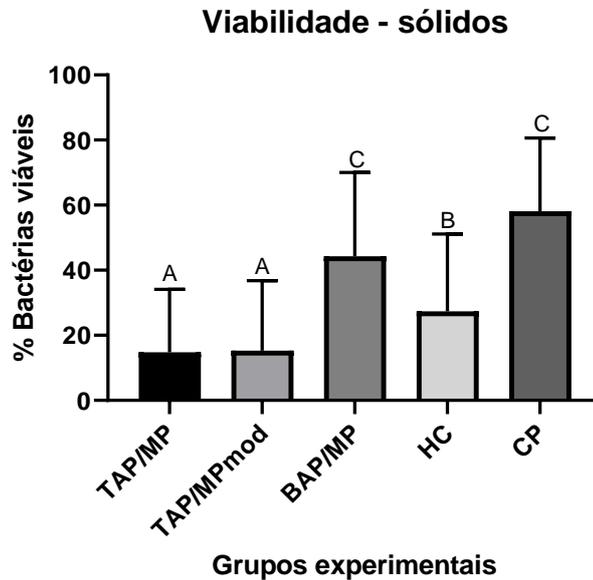
O grupo BAP/MP apresentou desempenho antibacteriano inferior em relação a todos os grupos ($p < 0,05$). Apesar de numericamente o grupo BAP/MP ter sido mais eficaz que o grupo CP, esta diferença não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$).

Tabela 6 - Valores da Mediana (med), mínimo e máximo (min-max) da porcentagem de células vivas do biofilme de *E. faecalis* em cada um dos grupos experimentais, tendo o macrogol e propilenoglicol como veículo.

Grupos experimentais	% Bactérias viáveis
TAP/MP	7.60 (0.0 – 91.40) ^A
TAP/MPmod	2.80 (0.0 – 87.30) ^A
BAP/MP	49.80 (0.0 – 97.10) ^C
HC	26.80 (0.0 – 98) ^B
CP	56.20 (14 – 100) ^C

Legenda: Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre os grupos experimentais ($p < 0,05$).

Gráfico 6 - Porcentagem de bactérias viáveis para cada grupo experimental com consistência sólida.



Legenda: Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os grupos experimentais ($p < 0,05$). Traços verticais representam o desvio padrão.

4.4.2 Consistência fluida

As porcentagens de células viáveis, no biofilme intratubular de *E. faecalis*, após terem sido colocados em contato por 14 dias, com as medicações antibióticas que tiveram como veículo o propilenoglicol, apresentando consistência fluida, além dos grupos HC e CP, estão apresentadas na tabela 7 e ilustradas pelo gráfico 7.

TAPmod, BAP e HC apresentaram atividade antimicrobiana superior aos demais grupos ($p < 0,05$) e estatisticamente semelhante entre si ($p > 0,05$).

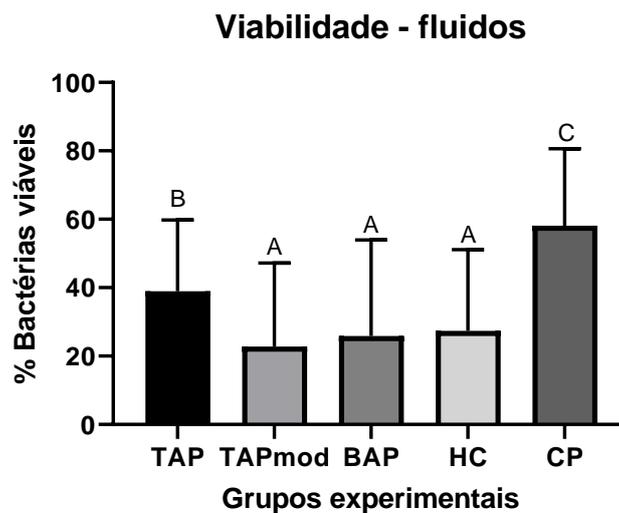
O grupo TAP apresentou desempenho antibacteriano superior ao grupo CP. ($p < 0,05$).

Tabela 7 - Valores da Mediana (med), mínimo e máximo (min-max) da porcentagem de células vivas do biofilme de *E. faecalis* em cada um dos grupos experimentais, tendo o propilenoglicol como veículo.

Grupos experimentais	% <i>Bactérias viáveis</i>
TAP	40.30 (0.0 – 81.60) ^B
TAPmod	14.45 (0.0 – 100) ^A
BAP	18.85 (0.0 – 100) ^A
HC	26.80 (0.0 – 98) ^A
CP	56.20 (14 – 100) ^C

Legenda: Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre os grupos experimentais ($p < 0,05$).

Gráfico 7 - Porcentagem de bactérias viáveis para cada grupo experimental com consistência fluida



Legenda: Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os grupos experimentais ($p < 0,05$). Traços verticais representam o desvio padrão.

4.5 Consistência sólida x Consistência fluida dos grupos antibióticos

A porcentagem de células viáveis, no biofilme intratubular de *E. faecalis*, após terem sido colocados em contato por 14 dias, com as medicações antibióticas nas consistências

fluida e sólida, estão apresentados na tabela 8 e ilustrados pelo gráfico 8.

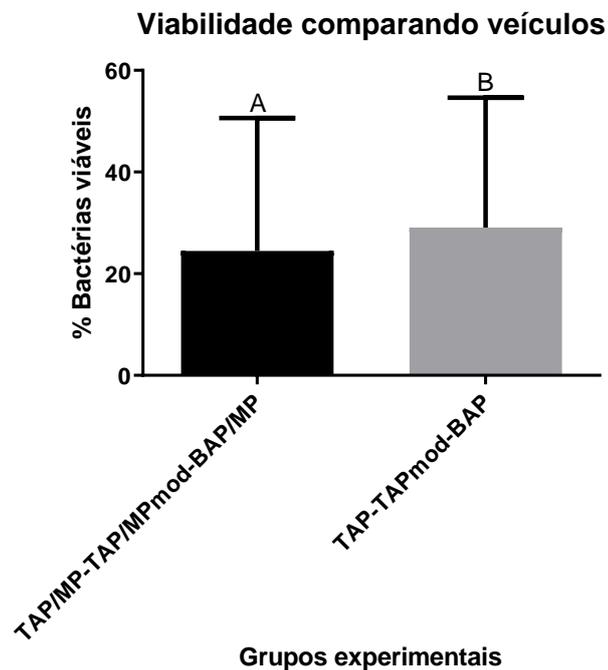
O grupo das medicações antibióticas com consistência sólida, em que foi utilizada a combinação de macrolol e propilenoglicol, apresentou atividade antimicrobiana estatisticamente superior ao grupo de medicações fluidas, que utilizaram apenas propilenoglicol ($p < 0,05$).

Tabela 8 - Valores da Mediana (med), mínimo e máximo (min-max) da porcentagem de células vivas do biofilme de *E. faecalis*, após contato com os grupos experimentais por 14 dias, comparando-se os diferentes veículos, independente das medicações antibióticas utilizadas.

Grupos experimentais	% Bactérias viáveis
TAP/MP + TAP/MPmod + BAP/MP	15.70 (0.0 – 97.10) ^A
TAP + TAPmod +BAP	26.0 (0.0 – 100) ^B

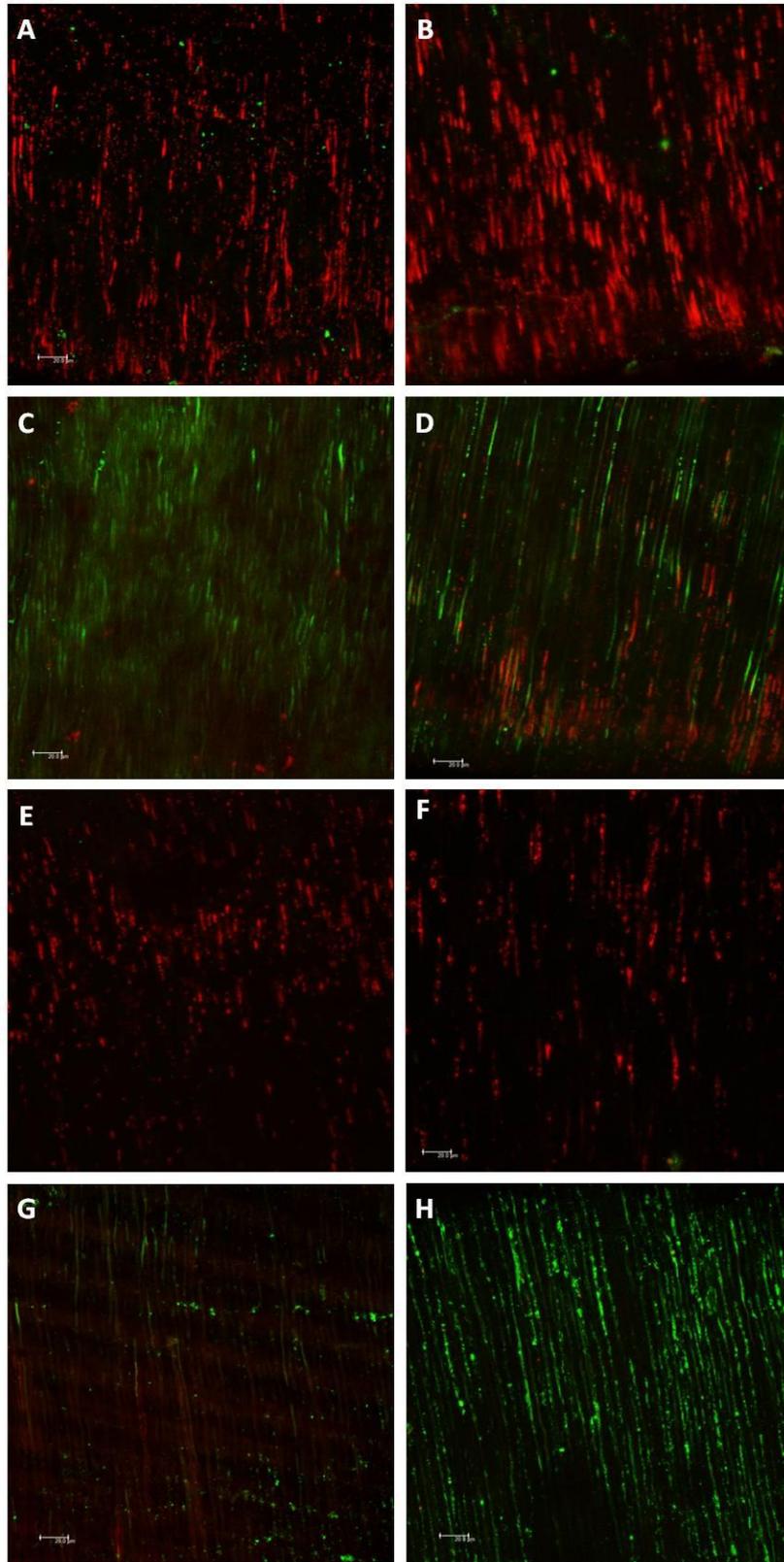
Legenda: Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre os grupos experimentais ($p < 0,05$).

Gráfico 8 - Porcentagem de bactérias viáveis para cada grupo experimental comparando-se os diferentes veículos, independente das medicações antibióticas utilizadas.



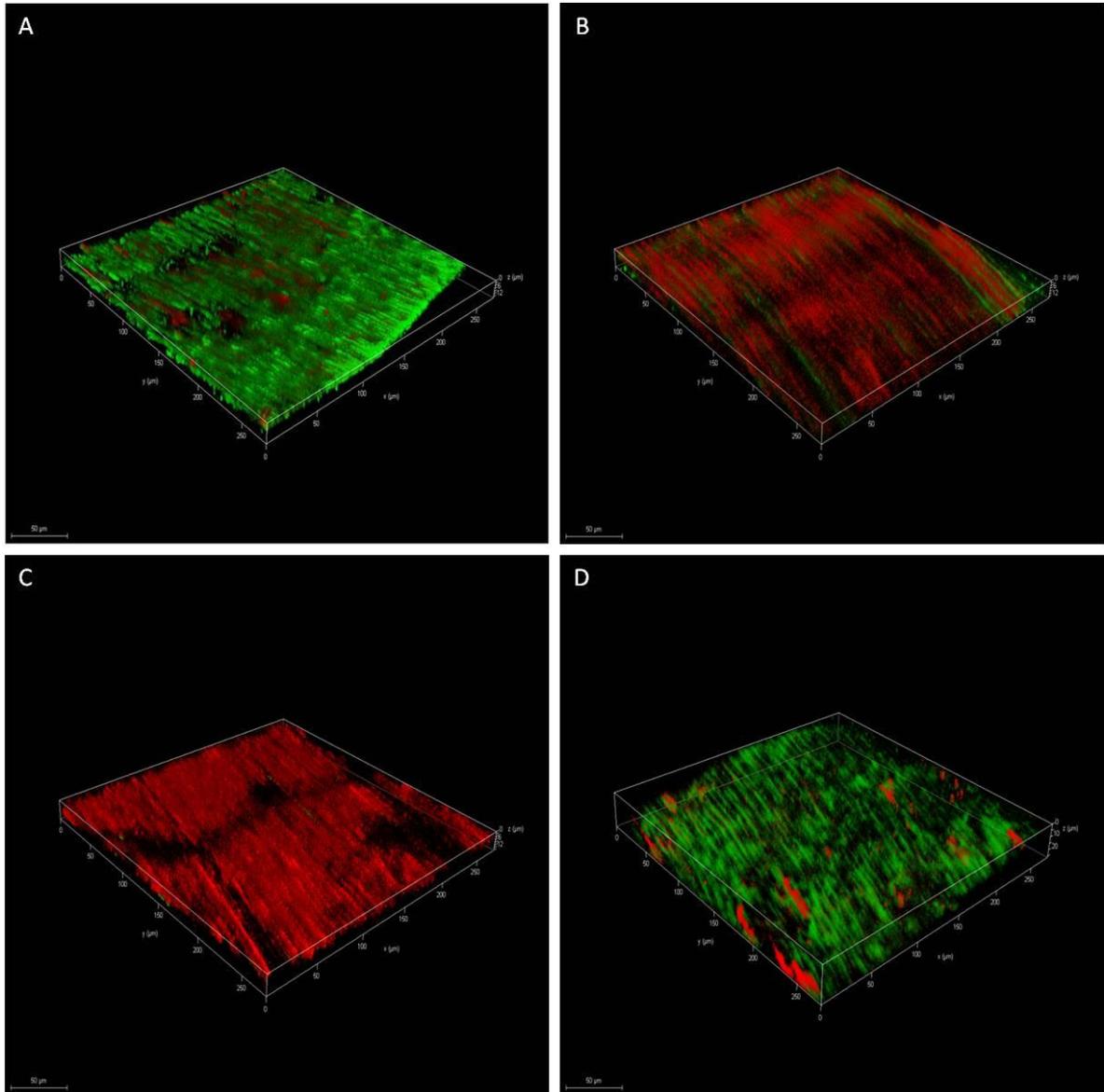
Legenda: Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os grupos experimentais ($p < 0,05$). Traços verticais representam o desvio padrão.

Figura 12 – Imagens ilustrativas obtidas por MCVL da viabilidade microbiana dos diferentes grupos experimentais após 14 dias de incubação em estufa.



Legenda: MCVL dos biofilmes dos grupos experimentais: (A) TAP/MP; (B) TAP/MPmod; (C) BAP/MP; (D) TAP; (E) TAPmod; (F) BAP; (G) HC; (H) CP. Células viáveis são observadas em verde e células não viáveis em vermelho. As imagens representam áreas de 275x 275 µm.
Fonte: O autor, 2019.

Figura 13 - Reconstrução tridimensional das imagens da MCVL dos biofilmes dos grupos experimentais que utilizaram o macrogol e o propilenoglicol como veículo e o grupo controle positivo, após 14 dias de incubação em estufa.



Legenda: Reconstrução tridimensional das imagens da MCVL dos biofilmes dos grupos experimentais: (A) CP; (B) TAP/MP; (C) TAP/MPmod; (D) BAP/MP. Células vivas são observadas em verde e células mortas em vermelho.

Fonte: O autor, 2019.

5 DISCUSSÃO

Neste estudo, foram avaliados, *in vitro*, os efeitos de seis combinações de medicações antibióticas/veículos na desinfecção intratubular de canais radiculares humanos contaminados por um biofilme bacteriano de *E. faecalis*, comparando-as ao Ca(OH)_2 . Os resultados mostraram que houve diferença entre a ação antibacteriana das substâncias, que são frequentemente utilizadas em técnicas endodônticas regenerativas, por isso, rejeitou-se a hipótese nula.

O sucesso do tratamento de revascularização, em dentes com polpas necrosadas que apresentam ápices imaturos e paredes dentinárias finas e frágeis, depende de uma apropriada desinfecção do SCR associada a uma mínima ou nenhuma instrumentação (BANCHS; TROPE, 2004, IWAYA; IKAWA; KUBOTA, 2001; SHAH et. al., 2008; TROPE, 2010) além da indução da formação de um coágulo sanguíneo (BANCHS, 2004; TROPE, 2008; DING et al 2009; RAMEZANI; SANAEI-RAD; HAJIHASSANI, 2019).

A necessidade de uma desinfecção eficaz, de amplo espectro, ocorre devido à natureza polimicrobiana do SCR, que contém bactérias aeróbias e anaeróbias (SASSONE et al. 2007). Essa complexidade da infecção endodôntica justificaria a necessidade de uma combinação de antibióticos (MOHAMMADI; ABBOTT, 2009). A pasta triantibiótica, formada por ciprofloxacina, metronidazol e minociclina, tem sua eficiência na atividade antimicrobiana demonstrada pela literatura (HOSHINO et al., 1996; SATO et al., 1992; SATO et al., 1996; WINDLEY et al. 2005).

Nessa pesquisa, os espécimes foram infectados com *E. faecalis*, uma bactéria Gram-positiva, anaeróbica facultativa, capaz de se organizar em biofilme (ZARGAR et al., 2018), tolerante a níveis altos de pH (ZANCAN et al., 2016), e por ter sido o microrganismo de escolha em estudos *in vitro* similares (ALBUQUERQUE et al., 2015; ARIAS et al., 2016; LATHAM et al., 2016; ZANCAN et al., 2019). Além disso, a capacidade de penetrar nos túbulos dentinários é um importante mecanismo de resistência bacteriana e o *E. faecalis* possui esta capacidade (SIQUEIRA; DE UZEDA; FONSECA, 1996).

O SCR possui regiões de difícil acesso, como istmos e túbulos dentinários, em que microrganismos podem permanecer viáveis mesmo após a ação químico-mecânica da instrumentação e da irrigação (SIQUEIRA et al., 2012) e dessa forma, perpetuarem os quadros de inflamação e doença (RICUCCI et al., 2009). Os trabalhos de análise de redução microbiana *ex vivo* que utilizam técnicas de contagem microbiana por UFC apresentam a

desvantagem de só analisarem basicamente a infecção que está presente no canal principal. Baseado nisto, o presente estudo buscou analisar a atividade antimicrobiana intratubular das medicações utilizadas em técnicas regenerativas endodônticas. Para tal, foi realizada uma avaliação da desinfecção por MCVL, que de acordo com Andrade et al. (2015) e Arias et al. (2016) é a técnica apropriada para avaliar em profundidade os túbulos dentinários. A fluorescência emitida pelas células, quando corados pelo kit *LIVE/DEAD® BacLight bacterial viability kit (Invitrogen Molecular Probes, Eugene, OR, EUA)*, permite a análise da profundidade da penetração dos microrganismos. Esse kit é composto por dois fluoróchromos com afinidade ao ácido nucleico: SYTO-9 e iodeto de propídio. Pela coloração desses dois fluoróchromos é possível determinar a viabilidade bacteriana, utilizando a integridade da membrana como parâmetro (PEREIRA et al., 2017).

O processo de contaminação, seguiu o modelo proposto por Andrade et al. (2015) que dura um período de cinco dias, realizando trocas periódicas de inóculo contaminado e de meio de cultura limpo, além de diferentes ciclos de centrifugação. Os espécimes foram padronizados, sendo os elementos dentários seccionados para serem obtidas amostras de 8 mm de comprimento e diâmetro dos canais de 1,1 mm. Cabe salientar que o tempo de permanência das medicações no interior dos canais, estipulado em 14 dias, obedece à recomendação da AAE (de 1 a 4 semanas) o mesmo que foi, também, utilizado em estudos anteriores (ARIAS et al., 2016; DEVARAJ; JAGANNATHAN; NEELAKANTAN, 2016; EL ASHIRY et al. 2016).

O primeiro uso da pasta triantibiótica, na revascularização pulpar foi descrito por Banchs e Trope (2004) que demonstraram o sucesso da terapia por meio da ausência de sintomas clínicos, fechamento apical e aumento na espessura das raízes. Entretanto, ainda não há um consenso em relação à concentração ideal para uma adequada desinfecção do SCR. Estudos mostram variações de 0,01 mg/mL (TAKUSHIGE et al., 2004) a 1000 mg/mL, (ALTHUMAIRY; TEIXEIRA; DIOGENES, 2014). Destaca-se que desde 2018, existe uma recomendação da AAE (<https://www.aae.org>) para o uso de pastas triantibióticas e biantibióticas em baixas concentrações (1 a 5mg/mL) ou de Ca(OH)₂, para a realização da terapia, por isso, no presente estudo, foi estabelecida a concentração das medicações antibióticas fluidas em 5mg/mL. Além disso, Jacobs et al. (2017) mostraram que essa concentração de 5mg/mL, na forma de pasta biantibiótica possui um bom efeito residual quando comparada com a pasta de Ca(OH)₂.

Por meio da análise por MCVL, pôde-se perceber que os grupos TAP/MP e TAP/MPmod, que se apresentaram com consistência sólida, devido à presença dos veículos

macrogol e propilenoglicol, sugerida por Hoshino (2007) (<http://www.lstr.jp/e/information.html>), com concentrações em torno de 1000 mg/mL (RUPAREL et al, 2012), foram aqueles que numa avaliação da viabilidade global, apresentaram as maiores atividades antimicrobianas, porém, sem diferença significativa em relação aos grupos TAPmod e BAP, que tiveram como veículos o propilenoglicol, de consistência fluida, em concentrações de 5 mg/mL. Esses resultados demonstram que as medicações em consistência sólida, que apresentam concentrações superiores, não resultaram em um maior efeito de morte bacteriana quando comparado às fluidas que utilizaram 5 mg/mL, indicando que podem não ser necessárias altas concentrações de antibióticos para uma adequada desinfecção intratubular.

Em relação ao Ca(OH)_2 , seu efeito antibacteriano tem sido documentado na literatura (BYSTROM; CLAESSOM; SUNDQVIST, 1985) e estão relacionados à liberação dos íons hidroxila que elevam o pH local, levando a uma desnaturação das proteínas bacterianas, danos às membranas e ao DNA (MOHAMMADI; DUMMER, 2011). Já em relação aos componentes da pasta triantibiótica, o metronidazol atua na inativação do DNA bacteriano, a ciprofloxacina sobre a atividade da DNA-girase e a minociclina impedindo a síntese proteica (ANVISA, 2007).

Comparando-se a atividade antimicrobiana das medicações antibióticas em relação ao Ca(OH)_2 , Adl et al. (2014) observaram que a pasta triantibiótica, em consistência pastosa, utilizando solução salina como veículo, foi mais efetiva na desinfecção do que a pasta de Ca(OH)_2 , também com salina. O presente estudo corrobora com Adl et al. (2014), pois, o grupo HC também apresentou atividade antibacteriana inferior às medicações antibióticas quando estas se apresentaram em consistência sólida e com três antibióticos em sua composição (TAP/MP e TAP/MPmod).

Neste estudo, o grupo TAP/MP, que representa o grupo triantibiótico numa concentração elevada, foi estatisticamente superior ao grupo HC. Esse resultado está de acordo com o encontrado por Zargar et al. (2018), Zancan et al. (2018) e Zancan et al. (2019), os quais analisaram a atividade antimicrobiana de TAP nas respectivas concentrações: 1000mg/mg, 1500mg/ml e 1500mg/ml, e também encontraram diferença significativa em relação ao grupo HC. Já o trabalho de Pereira et al. (2017) encontrou efeitos de desinfecção similares da TAP e da pasta de Ca(OH)_2 contra o biofilme intratubular de *E. faecalis*. É importante frisar que nesta pesquisa, o grupo HC mostrou atividade antimicrobiana contra o *E. faecalis*, apresentando diferença estatística em relação ao grupo CP, diferente do que foi observado nos trabalhos de Zancan et al. (2018) e de Zancan (2019), cujos veículos foram

respecitivamente polietilenoglicol e solução salina. Cabe salientar que nos dois trabalhos citados anteriormente, as medicações foram mantidas por sete dias, enquanto neste estudo elas permaneceram por 14 dias, tais diferenças metodológicas podem explicar as divergências encontradas.

Ao analisar a desinfecção em áreas mais profundas, afastadas do canal radicular principal, foi observado nesta pesquisa que o HC apresentou-se estatisticamente superior ao grupo CP, enquanto Zargar et al. (2018) não encontrou eficácia dessa medicação em profundidade após sete dias de utilização. As diferenças metodológicas quanto ao tempo de contato, a análise antimicrobiana e o veículo utilizado podem explicar as diferenças nos resultados.

Quando analisado o grupo dos antibióticos em consistência sólida, nota-se um melhor efeito bacteriano global das composições com três antibióticos, TAP/MP e TAP/MPmod em relação ao grupo com apenas dois, BAP/MP. Esse resultado inferior da pasta BAP/MP pode estar relacionado à associação entre uma maior granulação das partículas do pó do metronidazol, que se apresenta em maior quantidade na pasta BAP/MP e uma maior viscosidade do macrogol, o que pode ter dificultado a difusão dessa combinação antibiótica via túbulos dentinários, propiciando uma menor desinfecção intratubular. Os trabalhos de Zancan et al. (2018) e Zancan et al. (2019), também utilizaram antibióticos em concentração clínica, porém com solução salina como veículo, o que proporciona à composição uma consistência mais fluida e isso pode ter a resultados semelhantes entre as pastas tri e biantibiótica. Ressalta-se, que outros estudos que tenham utilizado MCVL e o macrogol como veículo são desconhecidos até o momento para uma comparação mais direta entre os resultados.

Analisando a desinfecção intratubular das pastas em consistência fluida, os resultados mostraram que os grupos TAP, TAPmod e BAP foram eficazes na desinfecção intratubular, apresentando resultados superiores e significativos em relação ao grupo CP. Os grupos TAPmod e BAP apresentaram, ainda, resultado superior ao grupo TAP, o que difere do trabalho de Devaraj; Jagannathan e Neelakantan (2016) que encontraram uma maior ação do grupo TAP em relação ao grupo BAP. Apesar de também utilizar a MCVL como ferramenta de análise, comparações entre esse estudo e o presente trabalho são limitadas devido ao emprego de diferentes metodologias de contaminação dos espécimes, o que poderia justificar as diferenças encontradas entre estes.

Alguns trabalhos tem associado substâncias à pasta de Ca(OH)_2 , foi o caso de Ghabraei et al. (2018), onde observaram que Ca(OH)_2 misturado com 2% CHX foi mais

potente que a TAP na eliminação do biofilme de *E. faecalis*. Nesta pesquisa, o grupo CH foi similar ao grupo TAP, inferior ao grupo TAP/MP, porém superior ao CP. Essa diferença de resultado pode estar relacionada à adição de um veículo ativo como a CHX ao $\text{Ca}(\text{OH})_2$.

Destaca-se que a grande desvantagem clínica da pasta triantibiótica vem sendo relacionada a uma indesejável alteração de cor ao elemento dentário. Nagata et al. (2014) observaram a alteração de cor na maioria dos casos tratados com pasta triantibiótica e associaram-na a presença de minociclina, assim como Akcay et al. (2014), num estudo realizado com dentes bovinos. Bezgin, et al. (2015), utilizando pasta triantibiótica modificada por cefaclor, não observou alteração de cor. O fato, de neste estudo, os grupos TAPmod e BAP, que não apresentam minociclina em sua composição, terem atuado de forma eficaz na descontaminação intratubular é um achado que enaltece o uso das combinações sem a minociclina. Ressalta-se, ainda, que trabalhos anteriores têm demonstrado eficiente capacidade antimicrobiana das pastas biantibióticas (SABRAH; YASSEN; GREGORY, 2013; DING et al., 2009; ALMEIDA, 2018).

Na região cervical, a TAP apresentou-se similar a BAP e menos eficiente que a TAPmod. O estudo de LIN et al. (2003), pode ajudar no entendimento dessa possível superioridade da TAPmod sobre a TAP, pois os autores observaram que a clindamicina apresentou uma melhor capacidade de penetrar nos túbulos dentinários em relação a tetraciclina. Numa análise exclusiva dos grupos sólidos, comparando-os ao $\text{Ca}(\text{OH})_2$ pôde-se observar que as combinações foram mais eficientes quando compostas por três antibióticos, sob a forma de TAP/MP e TAP/MPmod, enquanto a pasta BAP/MP, não foi tão eficaz, já o HC apresentou efeito antibacteriano inferior a TAP/MP e TAP/MPmod, porém, superior a BAP/MP. Acredita-se que a potência proporcionada pela maior combinação de componentes das pastas triantibióticas tenha sido fundamental para esse melhor desempenho.

A análise da viabilidade bacteriana comparando-se os veículos mostrou uma maior atividade antimicrobiana da combinação macrogol e propilenoglicol, em relação ao grupo com apenas propilenoglicol, porém, esse resultado deve provavelmente estar ligado às maiores concentrações dos antibióticos do que do tipo de veículo utilizado, já que para uma consistência da pasta similar a usada clinicamente, uma concentração de 1.000 mg/mL é necessária (RUPAREL et al., 2012).

Cabe salientar, ainda, que o RET tem demonstrado casos de sucesso em dentes maduros com polpa necrosada (PARYANI; KIM, 2013; SAOUD et al. 2016), além disso, um recente estudo apresenta a possibilidade de uso da técnica em retratamento de dente imaturo, o que adiciona uma nova perspectiva à terapia. (CYMERMAN; NOSRAT, 2020).

O equilíbrio entre excelente atividade antimicrobiana e baixa toxicidade às células humanas das substâncias utilizadas para a redução microbiana em Endodontia e, mais especificamente nas terapias regenerativas, deve ser um objetivo a ser alcançado. Os resultados deste estudo mostram que a pasta de Ca(OH)_2 e as pastas triantibióticas modificadas e biantibióticas, em concentrações baixas, tiveram um excelente desempenho na desinfecção intratubular do biofilme bacteriano de *E. faecalis*, similar em algumas análises às pastas triantibióticas em altas concentrações. Contudo, o Ca(OH)_2 comparado aos antibióticos, é uma substância comum à prática odontológica, sendo de fácil disponibilidade, além disso, não está relacionado a alterações de cor e nem à indução de resistência bacteriana. Ressalta-se que a Sociedade Europeia de Endodontia (2016) posiciona-se a favor do uso do Ca(OH)_2 ao invés do uso de antibióticos a fim de evitar alterações de cor. Outro aspecto que deve ser levado em conta, é a maior dificuldade de remoção da pasta antibiótica do SCR em relação ao Ca(OH)_2 , o que manteria a ação da medicação por um período além do necessário (BERKHOF et al., 2014).

Levando-se em consideração as limitações de um estudo *ex vivo* e a necessidade de um número maior de pesquisas com desenhos metodológicos diferentes, o presente estudo traz como possível contribuição à literatura científica, que as pastas triantibiótica modificada e biantibiótica, em concentrações de 5 mg/mL, além da pasta de Ca(OH)_2 , exercem uma importante atividade antimicrobiana sobre o biofilme de *E. faecalis*, e por estarem relacionadas à menor citotoxicidade celular e alterações de cor da coroa dentária, podem ser consideradas escolhas mais adequadas para os casos de terapias regenerativas.

CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, de acordo com a metodologia apresentada, é possível concluir que a pasta triantibiótica modificada foi a única combinação de antibióticos que apresentou resultados significativos de descontaminação sobre o biofilme intratubular de *E. faecalis* independente do veículo testado, TAP/MPmod ou TAPmod, e conseqüentemente, das concentrações. Além disso, destaca-se o desempenho das pastas de hidróxido de cálcio e biantibiótica com propilenoglicol (BAP) por apresentarem, em todas as análises, atividade antimicrobiana superior ao grupo controle e por vezes similar aos grupos de maior desempenho. Por isso, HC, TAPmod e BAP por exercerem uma importante atividade antimicrobiana intratubular sobre o biofilme de *E. faecalis*, podem ser consideradas alternativas adequadas à desinfecção do SCR nos casos de terapias regenerativas.

REFERÊNCIAS

- ADL, A. et al. The ability of triple antibiotic paste and calcium hydroxide in disinfection of dentinal tubules. *Iran Endod J.*, v. 9, n. 2, p.123-126, Mar.2014.
- AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Antimicrobianos – Bases teóricas e uso clínico. 2007. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/antimicrobianos.htm> Acesso em 20 Dez. 2019.
- AKCAY, M., et al. Spectrophotometric analysis of crown discoloration induced by various antibiotic pastes used in revascularization. *J Endod.*, v. 40, n. 6, p. 845-848, 2014.
- ALBUQUERQUE, M.T., et al. Effects of ciprofloxacin-containing scaffolds on *Enterococcus faecalis* biofilms. *J Endod.*, v.41, p. 710-714, 2015.
- ALGARNI, A.A.; YASSEN, G.H.; GREGORY, R.L. Inhibitory effect of gels loaded with a low concentration of antibiotics against biofilm formation by *Enterococcus faecalis* and *Porphyromonas gingivalis*. *J Oral Sci.*, v. 57, n. 3, p. 213-218, Sep. 2015.
- ALGUILAN, M.A., et al. Attachment and proliferation of dental pulp stem cells on dentine treated with different regenerative endodontic protocols. *Int Endod J.*, v.50, n. 7, p. 667-675, Jul. 2017.
- ALMEIDA, M.P. Efeito bactericida e alteração de cor proporcionada por medicações antibióticas em diferentes consistências. 2018. Undefined f. *Dissertação (mestrado em Odontologia)*. Universidade do Estado do Rio de Janeiro – Rio de Janeiro, Brasil, 2018.
- ALSAEED, T., et al. Antibacterial Efficacy and Discoloration Potential of Endodontic Topical Antibiotics. *J Endod.*, v. 44, n. 7, p. 1110-1114, Jul. 2018. doi: 10.1016/j.joen.2018.03.001. Epub 2018 May 24.
- ALTHUMAIRY, R,I; TEIXEIRA, F.B.; DIOGENES A. Effect of dentin conditioning with intracanal medicaments on survival of stem cells of apical papilla. *J Endod.*, v. 40, n. 4, p. 421-425, Apr. 2014.
- AMERICAN ASSOCIATION OF ENDODONTISTS (AAE). Glossary of endodontic terms. AAE 2019. Disponível em: <<https://www.aae.org/specialty/clinical-resources/glossary-endodontic-terms>>. Acesso em 02 Jan. 2020.
- AMERICAN ASSOCIATION OF ENDODONTISTS (AAE). Clinical Considerations for a Regenerative Procedure. Jan. 2018. Disponível em: <https://www.aae.org/specialty/wp-content/uploads/sites/2/2018/06/ConsiderationsForRegEndo_AsOfApril2018.pdf> Acesso em 12 Mar. 2019.
- ANDRADE, F.B., et al. A new improved protocol for in vitro intratubular dentinal bacterial contamination for antimicrobial endodontic tests: standardization and validation by confocal laser scanning microscopy. *J Appl Oral Sci*, v. 23, p. 591–598, 2015.
- ANTUNES, L.S, et al. The effectiveness of pulp revascularization in root formation of necrotic immature permanent teeth: A systematic review. *Acta Odontol Scand.*, v. 74, n. 3, p. 161-169, Jul. 2015.

- ARIAS, M.P. et al. Effect of ultrasonic streaming on intra-dental disinfection and penetration of calcium hydroxide paste in endodontic treatment. *Journal of Applied Oral Science*, v. 24, p. 575–581, 2016.
- ARRUDA M.E.F et al, Infection Control in Teeth with Apical Periodontitis Using a Triple Antibiotic Solution or Calcium Hydroxide with Chlorhexidine: A Randomized Clinical Trial. *J Endod.*, v.44, n.10, p.1474-1479, Oct. 2018.
- BANCHS, F.; TROPE, M. Revascularization of Immature Permanent Teeth With Apical Periodontitis: New Treatment Protocol? *J Endod.*, v. 30, n. 4, p. 196–200, Apr. 2004.
- BERKHOFF, J.A. et al. A. Evaluation of triple antibiotic paste removal by different irrigation procedures. *J Endod.*, v. 40, n. 8, p. 1172-1177, Aug. 2014.
- BEZGIN, T., et al. Efficacy of platelet-rich plasma as a scaffold in regenerative endodontic treatment. *J Endod.*, v.41, n. 1, p. 36-44, 2015.
- BOSE, R.; NUMMIKOSKI P.; HARGREAVES K. A retrospective evaluation of radiographic outcomes in immature teeth with necrotic root canal systems treated with regenerative endodontic procedures. *J Endod.*, v. 35, n. 10, p. 1343-1349, Aug. 2009
- BYSTROM, A.; CLAEISSON, R.; SUNDQVIST, G. The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. *Endod Dent Traumatol.*, v. 1, n. 5, p.170-175, 1985.
- BROOK, L., et al. Clindamycin in dentistry: more than just effective prophylaxis for endocarditis? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.*, v. 100, n. 5, p. 550-558, Nov. 2005.
- CHUEH, L.H. et al. Regenerative endodontic treatment for necrotic immature permanent teeth. *J Endod.*, v. 35, n. 2, p.160-164, Feb. 2009.
- CHUENSOMBAT, S. et al. Cytotoxic effects and antibacterial efficacy of a 3-antibiotic combination: an in vitro study. *J Endod.*, v. 39, n. 6, p. 813-819, Jun. 2013.
- COTTI, E.; MEREU, M.; LUSSO, D. Regenerative treatment of an immature, traumatized tooth with apical periodontitis: report of a case. *J Endod.*, v. 34, n. 5, p. 611-616, May 2008.
- CYMERMAN, J.J.; NOSRAT, A. Regenerative Endodontic Treatment as a Biologically Based Approach for Non-Surgical Retreatment of Immature Teeth. *J Endod.*, v. 46, n. 1, p. 44-50, Jan. 2020. doi:10.1016/j.joen.2019.10.010
- CVEK, M. Prognosis of luxated non-vital maxillary incisors treated with calcium hydroxide and filled with gutta-percha. A retrospective clinical study. *Endod Dent Traumatol.* v. 8, p. 45–55, 1992.
- DEVARAJ, S.; JAGANNATHAN, N.; NEELAKANTAN, P. Antibiofilm efficacy of photoactivated curcumin, triple and double antibiotic paste, 2% chlorhexidine and calcium hydroxide against *Enterococcus fecalis* in vitro. *Sci. Rep.*, v. 21, n. 6, p. 24797, Apr. 2016.
- DING, R.Y. et al. Pulp revascularization of immature teeth with apical periodontitis: A clinical study. *J Endod.*, v. 35, n. 5, p.745-749, May. 2009.

- DIOGENES, A.R., et al. Translational science in disinfection for regenerative endodontics. *J Endod.*, v. 40, n. 4, Suppl. 52-57, Apr. 2014.
- EL ASHIRY, E.A., et al. Dental pulp revascularization of necrotic permanent teeth with immature apices. *J Clin Pediatr Dent.*, v. 40, p. 361-366, 2016.
- ESLAMI, L.M. The Comparison of Intracanal Medicaments, Diode Laser and Photodynamic Therapy on Removing the Biofilm of *Enterococcus faecalis* and *Candida Albicans* in the Root Canal System (Ex-vivo Study). *Photodiagnosis Photodyn Ther.*, Jan 2019.
- FAHMY, S.H., et al. Investigation of the regenerative potential of necrotic mature teeth following different revascularisation protocols. *Aust Endod J.*, v. 43, n.2, p. 73-82, Aug. 2017.
- FARIA, G. et al. Influence of the Vehicle and Antibiotic Formulation on Cytotoxicity of Triple Antibiotic Paste. *J. Endod.*, v. 44, n. 12, p. 1812-1816, Dec. 2018.
- GHABRAEI, S. et al. Comparison of Antimicrobial Effects of Triple Antibiotic Paste and Calcium Hydroxide Mixed with 2% Chlorhexidine as Intracanal Medicaments Against *Enterococcus faecalis* Biofilm. *J Dent.*, v.15, n.3, p. 151-160, May 2018.
- GOMES-FILHO, J. E. et al. Tissue reaction to a triantibiotic paste used for endodontic tissue self-regeneration on nonvital immature permanent teeth. *J. Endod.*, v. 38, n. 1, p. 91-94, Jan. 2012.
- HAAPASALO, M.; ORSTAVIK, D. In vitro infection and disinfection of dentinal tubules. *J Dent Res.*, v. 66, n. 8, p. 1375-1379, Aug. 1987.
- HWANG, D. et al. Efficacy of different carriers for the triple antibiotic powder during regenerative endodontic procedures. *Aust Endod J.*, v. 44, n. 3, p. 208 – 214, Dec. 2018.
- HOSHINO, E. et al. *In vitro* antibacterial susceptibility of bacteria taken from infected root dentine to a mixture of ciprofloxacin, metronidazole and minocycline. *Int Endod J.*, v. 29, n. 2, p. 125-130, Mar. 1996.
- HOSHINO, E.; TAKUSHIGE, T. LSTR 3MIX-MP method-better and efficient clinical procedures of lesion sterilization and tissue repair (LSTR) therapy. *Dent Rev.*, v. 666, p. 57-106, 1998.
- HOSHINO, E. Information on LSTR 3Mix-MP Therapy: Lesion sterilization and tissue repair (LSTR) Therapy – LSTR 3Mix-MP Therapy. 2007. Disponível em: <<http://www.lstr.jp/e/information.html> > Acesso em: 01 Jun. 2019.
- IWAYA, S.I.; IKAWA, M.; KUBOTA, M. Revascularization of an immature permanent tooth with apical periodontitis and sinus tract. *Dent Traumatol.*, v.17, n. 4, Aug. 2001.
- JACOBS, J.C., et al. Antibacterial Effects of Antimicrobials Used in Regenerative Endodontics against Biofilm Bacteria Obtained from Mature and Immature Teeth with Necrotic Pulp. *Journal of Endodontics*, v.43, n.4, p. 575 -579, Apr. 2017.
- JAGDALE, S., et al. Comparative evaluation of coronal discoloration induced by two triple antibiotic revascularization protocols when used at varying depths of temporary sealing material at the end of varying time periods. *J Conserv Dent.*, v. 21, n. 4, p. 388-393, Jul-Aug. 2018. doi: 10.4103/JCD.JCD_117_17.

- JENKS, D.B., et al. Residual antibiofilm effects of various concentrations of double antibiotic paste used during regenerative endodontics after different applications times. *Arch Oral Biol.*, v. 70, p. 88-93, Oct. 2016.
- KAHLER; ROSSI-FEDELE. A Review of Tooth Discoloration after Regenerative Endodontic Therapy. *J Endod.*, v. 42, n. 4, p. 563-569, Apr. 2016.
- KAMOLTHIP S., et al. Modified Apexification Procedure for Immature Permanent Teeth with a Necrotic Pulp/Apical Periodontitis: A Case Series. *J Endod.*, v. 46, n 1, p. 116 – 123, Jan. 2020.
- KUMAR, R, et al. MTA apical plug and clinical application of anatomic post and core for coronal restoration: A case report. *Iran Endod J.*, v. 6, n. 2, p. 90-94, 2011.
- LATHAM, J., et al. Disinfection Efficacy of Current Regenerative Endodontic Protocols in Simulated Necrotic Immature Permanent Teeth.. *J Endod.*, v. 42, n. 8, p. 1218-1225, Aug. 2016.
- LAW, A.S. Considerations for Regeneration Procedures. *J Endod.*, v. 39, n 3S, S. 44– 56, Mar. 2013
- LEONARDO, M.R., et al. Histological evaluation of therapy using a calcium hydroxide dressing for teeth with incompletely formed apices and periapical lesions. *J Endod.*, v. 19, p. 348–352, 1993.
- LIN, S., et al. Reduction of viable bacteria in dentinal tubules treated with clindamycin or tetracycline. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* v. 96, n.6, p. 751-756, Dec. 2003.
- LOVELACE, T.W., et al. Evaluation of the delivery of mesenchymal stem cells into the root canal space of necroticimmature teeth after clinical regenerative endodontic procedur e. . *J Endod.*, v. 37, n. 2, p. 133-138, Feb. 2011.
- MARCIANO M., et al. The use of confocal laser scanning microscopy in endodontic research: Sealer/ dentin interfaces. *Microscopy: Science, technology, applications and education. Formatex Microscopy Series* v. 3, p. 566-570, 2010.
- MARINHO, A.C., et al. Does the Reciproc file remove root canal bacteria and endotoxins as effectively as multfile rotary systems? *Int Endod J.*, v. 48, n. 6, p. 542–548, 2015. <https://doi.org/10.1111/iej.12346>
- MOHAMMADI, Z.; ABBOTT, PV. On the local applications of antibiotics and antibiotic-based agents in endodontics and dental traumatology. *Int Endod J.* v.42, n. 7, p. 555-567, 2009.
- MOHAMMADI, Z.; DUMMER, PM. Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology. *Int Endod J.*, v.44, n. 8, p. 697-730, 2011.
- MONTERO-MIRALLES, P., et al. Effectiveness and clinical implications of the use of topical antibiotics in regenerative endodontic procedures: a review. *Int Endod J.*, v. 51, n. 9, p. 981-988, Sep. 2018.
- NAGATA, J.Y., et al., Traumatized immature teeth treated with two protocols of pulp revascularization. *J Endod.*, v.40, n.5, p. 606-612, 2014.

- NEELAMURTHY, P.S, et al. Revascularization in Immature and Mature Teeth with Necrotic Pulp: A Clinical Study. *J Contemp Dent Pract.*, v.19, n. 11, p. 1393-1399, Nov. 2018.
- PARYANI, K.; KIM, S.G. Regenerative endodontic treatment of permanent teeth after completion of root development: a report of 2 cases. *J Endod.* v. 39, p. 929-934, 2013.
- PEREIRA, T.C., et al. Intratubular decontamination ability and physicochemical properties of calcium hydroxide pastes. *Clin Oral Investig.*, Jul. 2018.. doi: 10.1007/s00784-018-2549-0.
- PEREIRA, T.C., et al. Intratubular disinfection with tri-antibiotic and calcium hydroxide pastes, *Acta Odontologica Scandinavica*, v.75, n. 2, p. 87 – 93, Mar. 2017. DOI: 10.1080/00016357.2016.1256427.
- POLY, A. et al. Ability of two single-step restorative materials to avoid crown darkening caused by intracanal minocycline paste. *Clin Oral Investig.*, v. 23, n. 3, p. 1281-1286, Mar. 2019.
- PORTER, L.M. et al. Effects of novel 3-dimensional antibiotic-containing electrospun scaffolds on dentin discoloration. *J Endod.*, v.42, n.1, p.106-112, Jan. 2016.
- RAFTER, M. Apexification: a review. *Dent Traumatol.*, v. 21, p. 1-8, 2005.
- RAMEZANI, M.; SANAEI-RAD, P.; HAJIHASSANI, N. Revascularization and vital pulp therapy in immature molars with necrotic pulp and irreversible pulpitis: A case report with two-year follow-up. *Clin Case Rep.*, v. 8, n. 1, p. 206-210, Jan. 2020.
- REYHANI, M.F., et al. Evaluation of Antimicrobial Effects of Different Concentrations of Triple Antibiotic Paste on Mature Biofilm of *Enterococcus faecalis*. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects*, n.9, v. 3, p. 138 – 143, Summer 2015.
- REYNOLDS, K.; JOHNSON, J.D.; COHENCA, N. Pulp revascularization of necrotic bilateral bicuspid using a modified novel technique to eliminate potential coronal discoloration: a case report. *Int Endod J.* v. 42, n. 1, p. 84-92, Jan 2009.
- RICUCCI, D. et al. Histologic Investigation of Root Canal–treated Teeth with Apical Periodontitis: A Retrospective Study from Twenty-four Patients. *J Endod.*, v.35, n.4, p. 493-502, Apr. 2009.
- RUPAREL, NB et al. Direct effect of intracanal medicaments on survival of stem cells of the apical papilla. *J Endod*, v. 38, p. 1372–1375, 2012.
- SABRAH, A.H.A.; YASSEN, G.H.; GREGORY, R.L. Effectiveness of antibiotic medicaments against biofilm formation of *Enterococcus faecalis* and *Porphyromonas gingivalis*. *J. Endod.* v. 39, n.11, p. 1385–1389, Nov. 2013.
- SABRAH, AH. et al. The effect of diluted triple and double antibiotic pastes on dental pulp stem cells and established *Enterococcus faecalis* biofilm. *Clin Oral Investig*, v. 19, p. 2059 – 2066, 2015.
- SANTOS, L.G.P.D., et al. Alternative to Avoid Tooth Discoloration after Regenerative Endodontic Procedure: A Systematic Review. *Braz Dent J.*, v. 29, n. 5, Sep-Oct. 2018. doi: 10.1590/0103-6440201802132.

- SAOUD, T.M., et al. Treatment of mature permanent teeth with necrotic pulps and apical periodontitis using regenerative endodontic procedures: a case Series. *J Endod.*, v.42, p. 57-65, 2016.
- SARMAD, M.A. et al. Direct and indirect antibacterial effects of various concentrations of triple antibiotic pastes loaded in a methylcellulose system, *Journal of Oral Science*, v. 58, n. 4, p. 575 - 582, 2016.
- SASSONE, L.M., et al. Evaluation of the microbiota of primary endodontic infections using checkerboard DNA-DNA hybridization. *Oral Microbiol Immunol.*, v. 22, n. 6, p. 390-397, Dec. 2007.
- SATO, I. et al. Sterilization of infected root-canal dentine by topical application of a mixture of ciprofloxacin, metronidazole and minocycline in situ. *Int Endod J.*, v. 29, n. 2, p. 118-124, Mar. 1996.
- SATO, T. et al. Bactericidal efficacy of a mixture of ciprofloxacin, metronidazol, minocycline and rifampicin against bacteria of carious and endodontic lesions of human deciduous teeth *in vitro*. *Microbial Ecology in Health and Disease.*, v. 5, p. 171-177, 1992.
- SHAH, N. et al. Efficacy of revascularization to induce apexification/apexogenesis in infected, nonvital, immature teeth: A pilot clinical study. *J Endod.*, v. 34, n. 8, p. 915-925, Aug. 2008.
- SHOKOUHINEJAD, N. et al. Prevention of coronal discoloration induced by regenerative endodontic treatment in an ex vivo model. *Clin Oral Investig.*, v.22, n. 4, p. 1725–1731, May. 2018,
- SIMSEK, H. et al. Investigation of mineral content of root canal dentin after the application of various antibiotic paste using energy-dispersive Xray detector. *Microsc Res Tech.*, v. 82, n. 2, p. 144-148, Feb. 2019.
- SIQUEIRA JR, J.F; DE UZEDA, M.; FONSECA, M.E. A scanning electron microscopic evaluation of in vitro dentinal tubules penetration by selected anaerobic bacteria. *J Endod.* , v. 22, p. 308-310, 1996.
- SIQUEIRA JR, et al. Princípios biológicos do tratamento endodôntico de dentes com polpa necrosada e lesão perirradicular. *Rev. Bras. Odontol.* v. 69, n 1, Jan/Jun., 2012
- TAGELSIR, A. et al. Effect of Antimicrobials Used in Regenerative Endodontic Procedures on 3-week-old *Enterococcus faecalis* Biofilm. *J Endod.*, v. 43, n. 2, p. 258-262, Feb. 2016.
- TAKUSHIGE, T. et al. Endodontic treatment of primary teeth using a combination of antibacterial drugs. *Int Endod J.*, v. 37, n. 2, p. 132-138, Feb. 2004.
- TROPE, M. Regenerative potential of dental pulp. *J. Endod.*, v. 34, n. 7 Suppl, p. S13-17, Jul. 2008.
- TROPE M. Treatment of the immature tooth with a non-vital pulp and apical periodontitis. *Dent Clin North Am.*, v. 54, n.2, p. 313-324, Apr. 2010.
- TZIAFAS, D.; KODONAS, K. Differentiation potential of dental papilla, dental pulp, and apical papilla progenitor cells. *J Endod.*, v. 36, n. 5, p. 781-789, May 2010.

WITHERSPOON, DE., SMALL, JC., REGAN, JD., et al. Retrospective analysis of open apex teeth obturated with mineral trioxide aggregate. *J Endod.*, v.34, p. 1171-1176, 2008.

WINDLEY, W. et al. Disinfection of immature teeth with a triple antibiotic paste. *J. Endod.*, v. 31, n. 6, p. 439-443, Jun. 2005.

ZANCAN, R. F., et al. (2016). Antimicrobial activity and physicochemical properties of calcium hydroxide pastes used as Intracanal medication. *J Endod.*, v. 42, n. 12, p. 1822–1828, Dec., 2016.

ZANCAN, R.F., et al. Antimicrobial activity of intracanal medications against both *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans* biofilm. *Microsc Res Tech.*, p. 1-7, Dec. 2018.

ZANCAN, R.F., et al. Antimicrobial Activity and Physicochemical Properties of Antibiotic Pastes Used In Regenerative Endodontics. *Brazilian Dental Journal*, v. 30, n. 6, p. 536-541, Nov-Dec., 2019. <http://dx.doi.org/10.1590/0103-6440201902613>.

ZARGAR, N. et al. Antimicrobial efficacy of clindamycin and triple antibiotic paste as root canal medicaments on tubular infection: An in vitro study. *Aust Endod J.*,v. 25, n. 1, p. 86-91, Aug., 2018.

ANEXO - Parecer do comitê de Ética em pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Atividade antimicrobiana por diferentes medicações antibióticas usadas em técnicas regenerativas endodônticas sobre o biofilme de *Enterococcus faecalis*: análise com microscopia confocal

Pesquisador: MIGUEL ANGELO DA CUNHA NETO

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 18258819.9.0000.5259

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia da UERJ

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.619.523

Apresentação do Projeto:

O presente estudo tem como objetivo avaliar e quantificar, por meio de análise microscópica confocal a laser, o grau de desinfecção proporcionada por medicações antibióticas, utilizadas em técnicas regenerativas endodônticas, em diferentes formulações e consistências, sobre o biofilme de *Enterococcus faecalis* formado em dentina humana. Serão confeccionados 90 cilindros de dentina, que serão contaminadas com uma cultura de *E. faecalis*, para a formação de biofilme intrarradicular. As amostras serão divididas em seis grupos antibióticos (n=10) de acordo com a formulação da medicação antibiótica testada e da sua consistência, um grupo com pasta de hidróxido de cálcio e dois grupos controle (n=10). Após a aplicação das medicações antibióticas, os cilindros de dentina serão cortados longitudinalmente e as superfícies serão coradas com o corante fluorescente LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability solution e analisados através do Confocal Scanning Laser Microscopy (CSLM). As imagens obtidas no CSLM serão convertidas por meio do Leica Software Application Suite-Advanced Fluorescence (Mannheim, Baden-Württemberg, Alemanha) e após processadas no software Bioluminescence v21, para quantificação da porcentagem de bactérias viáveis (verde) e não viáveis (vermelho). Caso a distribuição normal dos dados seja confirmada pelo Teste Shapiro-Wilk, a análise será realizada utilizando-se o One-Way análise de variância. Comparações Post-hoc pair-wise serão realizadas utilizando-se o teste Tukey para múltiplas comparações. Mediante os resultados obtidos a partir do presente projeto espera-se demonstrar os efeitos antibacterianos das medicações antibióticas testadas, baseando cientificamente a utilização desses medicamentos em protocolos de regeneração/revascularização pulpar.



Continuação do Parecer: 3.619.523

Objetivo da Pesquisa:

O estudo tem como objetivo avaliar e quantificar, por meio de análise microscópica confocal a laser, o grau de desinfecção proporcionada por medicações antibióticas, utilizadas em técnicas regenerativas endodônticas, em diferentes formulações e consistências, sobre o biofilme de *Enterococcus faecalis* formado em dentina humana.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há riscos para os participantes da amostra

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O presente estudo possui modelo de caráter experimental, *in vitro*, utilizando uma amostra de 90 caninos humanos (superiores e inferiores). Os procedimentos serão realizados nos laboratórios da Faculdade de Odontologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (FO/UERJ) e da Faculdade de Odontologia de Bauru, da Universidade de São Paulo (FOB-USP). A pesquisa está bem estruturada e o referencial teórico e metodológico estão explicitados, demonstrando aprofundamento e conhecimento necessários para sua realização. As referências estão adequadas e a pesquisa é exequível.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram analisados os seguintes documentos de apresentação obrigatória:

- 1) Folha de Rosto para pesquisa envolvendo seres humanos: Documento devidamente preenchido, datado e assinado
- 2) Projeto de Pesquisa: Adequado
- 3) Orçamento financeiro e fontes de financiamento: adequado/apresentado
- 4) Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ou Justificativa: Adequado
- 5) Cronograma: pertinente as informações
- 6) Documentos pertinentes à inclusão do HUPE: Adequado
- 7) Currículo do pesquisador principal e demais colaboradores: anexados e conforme as normas.

Recomendações:

Não há

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto pode ser realizado da forma como está apresentado. Diante do exposto e à luz da Resolução CNS nº466/2012, o projeto pode ser enquadrado na categoria – APROVADO.



Continuação do Parecer: 3.619.523

Considerações Finais a critério do CEP:

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e termo de consentimento livre e esclarecido. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a resposta do Comitê, após análise das mudanças propostas. 2. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes. 3. O Comitê de Ética solicita a V. S^a., que ao término da pesquisa encaminhe a esta comissão um sumário dos resultados do projeto.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_1383349.pdf	02/07/2019 14:54:51		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de	just_tcle_miguel.pdf	02/07/2019 14:54:06	MIGUEL ANGELO DA CUNHA NETO	Aceito
Ausência	just_tcle_miguel.pdf	02/07/2019 14:54:06	MIGUEL ANGELO DA CUNHA NETO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_plataformabrasil2019_miguel.docx	02/07/2019 13:33:21	MIGUEL ANGELO DA CUNHA NETO	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	aut_institucional.pdf	02/07/2019 13:22:28	MIGUEL ANGELO DA CUNHA NETO	Aceito
Folha de Rosto	folha_rosto.pdf	02/07/2019 13:21:44	MIGUEL ANGELO DA CUNHA NETO	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIO DE JANEIRO, 03 de Outubro de 2019

Assinado por:
WILLE OIGMAN
(Coordenador(a))