

Método *in-vitro* para Avaliação da Micro-infiltração Bacteriana em Materiais de Obturação Endodôntica

AUTOR: JOSÉ PEDRO CASIMIRO DE DUARTE BERNARDINO¹,
ORIENTADORA: IRENE GRAÇA AZEVEDO PINA VAZ² E
COORIENTADORA: MARIA BENEDITA ALMEIDA GARRETT DE
SAMPAIO MAIA³

¹*Estudante Mestrado Integrado em Medicina Dentária, FMDUP*

²*Professora Associada, Departamento de Endodontia, FMDUP*

³*Professora Auxiliar, Departamento de Microbiologia, FMDUP*

3 de Junho de 2013

Conteúdo

Resumo	2
Abstract	3
I Introdução	4
1 Métodos para avaliação da micro-infiltração	4
1.1 Micro-infiltração com corantes	5
1.2 Micro-infiltração com isótopos radioativos	6
1.3 Micro-infiltração com filtração por pressão de fluidos . . .	6
1.4 Micro-infiltração com bactérias	7
2 Objetivos do trabalho	9
II Materiais and Métodos	11
III Resultados	14
IV Discussão	17
V Bibliografia	19
VI Agradecimentos	23

Resumo

Introdução: A capacidade de selamento dos materiais de obturação endodôntica é um fator determinante para o sucesso do tratamento endodôntico radical. Hoje em dia o método mais comum usado para testar a infiltração bacteriana através dos canais dentários obturados recorre a modelos de câmara dupla. Apesar da sua popularidade, esse modelo experimental não escapa às críticas, nomeadamente em relação à falta de consistência dos resultados e acredita-se que essa variabilidade, é devida a fatores, não controlados, como a existência de vias alternativas de infiltração, que não pelo canal radicular obturado, bem como outros erros sistemáticos tais como a inadequação dos controlos negativos. Este trabalho pretende desenvolver um protótipo que prescinde de dentes humanos com o objectivo de excluir vias de infiltração alternativas, minorando as críticas apontadas, no sentido de objetivar resultados.

Materiais e métodos: Um total de 60 modelos de câmara dupla foram preparados utilizando “endo-trainers” em substituição de dentes humanos. Os 60 modelos foram divididos em igual número (n=15) pelos seguintes grupos: grupo experimental K, grupo experimental T, grupo controlo positivo e grupo controlo negativo. Os controlos negativos eram desprovidos de canal, os controlos positivos eram constituídos por uma canal obturado somente com um cone de guta-percha, nos grupos experimentais K e T os canais foram obturados com cones de guta-percha e os cimentos Kerr Pulp Canal Sealer e Topseal respectivamente. Nas câmaras apical foi colocado um inóculo de *E. faecalis* e a penetração bacteriana foi avaliada durante 7 dias.

Resultados: Após 7 dias de experiência, 15 modelos apresentaram infiltração: 2 controlos negativos, 4 controlos positivos, 5 do grupo do cimento Kerr e 4 do grupo do cimento Topseal.

Conclusão: O modelo apresentado pode ser validado como um modelo *in-vitro* para estudo da infiltração bacteriana. Os controlos negativos neste protocolo precisam de assegurar maior fiabilidade. Contudo, devido ao curto período de experiência, não é possível tirar conclusões sobre a eficácia dos cimentos.

Palavras-chave: bacteria, leakage, endodontics, root canal, sealers.

Abstract

Introduction: The sealing ability of root canal filling materials is a key factor for the success of endodontic treatment. Nowadays the most widespread method to assess these properties is to mount filled dental roots in a two chamber model. The upper chamber is inoculated with bacteria and leakage through the root filling is verified when contamination of the lower sterile broth occurs. Although, it's widely used, this method has several flaws, results are highly discordant and in most studies negative controls fail to discard other leakage routes leading to the lower chamber than the root canal. Attending to this premises our work aims to provide an experimental prototype, excluding other possibilities of leakage by replacing the human teeth by a plastic model.

Materials and methods: 60 dual chamber models were prepared with "endo-training blocs" as a substitute for human teeth. The models were divided in equal number (n=15) in the following groups: experimental group, K experimental group T, positive and negative controls. The negative controls were made with the remaining portion of the "endo-trainer", without a canal; positive controls were filled with gutta-percha without sealer, group K and T were filled with gutta-percha plus the respective sealers Kerr - Pulp Canal Sealer and Topseal. The upper chambers were inoculated with *E. faecalis* and leakage in lower chambers was assessed by means of turbidity for 7 days.

Results: After 7 days of experiment, 15 models showed leakage: 2 negative controls, 4 positive controls, 5 of K group and 4 of T group.

Conclusion: The design of our prototype can be reliable as a new protocol to study bacterial leakage through endodontic sealers. Some technical aspects must however be improved to turn the negative controls completely reliable. Due to the short period of the experiment, it was not possible to have results about the sealers.

Keywords: bacteria, leakage, endodontics, root canal, sealers.

I. Introdução

Antes do início da endodôntia moderna, a relação entre bactérias, infecções pulpares e periápice já tinha sido observada em meados do século XIX por Wiloughby Dayton Miller [1]. Hoje em dia, é comumente aceite que as infecções pulpares podem ter duas formas: a infecção primária e a infecção secundária. A infecção primária, caracteriza-se por uma agressão da polpa que culminou na sua necrose e posterior colonização bacteriana [2]. A infecção secundária diz respeito à infecção que persiste após o tratamento dos dentes infetados, apresentando características particulares e distintas da infecção primária [3, 4]. Com tratamento endodontico radical, pretende-se eliminar a população bacteriana do sistema de canais radiculares, remover a dentina afetada e dar forma ao canal de modo a ser possível obter uma obturação com um selamento apical, o mais hermético possível.

A importância desse selamento torna-se capital tentando impedir que as bactérias que possam persistir, mesmo após o um tratamento endodôntico criterioso, tenham a possibilidade de atingir o periápice, originar uma infecção secundária e consequentemente conduzir ao insucesso do tratamento [3]. Atualmente, o mecanismo das infecções secundárias é ainda polémico, não estando claro se a percolação de fluidos periapicais através da obturação pode reativar a proliferação das bactérias que sobreviveram ao tratamento endodontico ou se as bactérias orais conseguem atingir o periápice através do canal dentário obturado [5].

Por esse motivo, apesar do aprimoramento das técnicas endodônticas e dos avanços em microbiologia, a importância da capacidade selante dos materiais de obturação endodôntica continua a ser alvo de estudo e de debate.

1 Métodos para avaliação da micro-infiltração

Na década de 80 houve um aumento significativo das publicações relacionadas com a micro-infiltração nos materiais de obturação endodônticos; Wu *et al.* [6] reportam um acréscimo de 21.3% dessas publicações no *Journal of Endodontics*. Essa tendência revela o grande interesse e clínicos e investigadores na pesquisa dos materiais que proporcionem uma maior capacidade de selamento. O estudo de Washington [7], o qual demonstrou, depois de dois anos de *follow-up* que mais de 60% dos fracassos em endodontia são devidos a defeitos na obturação dos canais que permitem a passagem de fluídos e/ou bactérias. Em face desses resultados Ingle e Dow [8], numa experiência *ex-vivo*, demonstraram a penetração

de fluidos com um isótopos radioativo em dentes obturados. Especulando sobre as consequências dessa percolação. Não é claro, de um ponto de vista clínico, se ocorre passagem direta de bactérias para o periápice ou se os fluídos periapicais reactivam a proliferação de bactérias remanescentes após o tratamento endodôntico [5].

Em 2006, Fabricius *et al.* [9] demonstraram em animais, que a qualidade da obturação não tem influência sobre a cura de lesões periapicais de origem endodôntica, desde que não persistam bactérias aquando da obturação. Isto sugere que a percolação de fluidos vindos do periápice por si só não compromete o tratamento endodôntico.

No entanto, vários estudos [3, 4] demonstram que, apesar da instrumentação e desinfecção dos canais, a remoção e eliminação total dos microrganismos é extremamente difícil ou impossível, reforçando a importância de uma obturação que forneça um bom selamento apical. De acordo com esta visão, está o estudo de Toronto [10], que salienta que os principais indicadores para o sucesso do tratamento endodôntico radical são: ausência prévia de lesões periapicais, a qualidade da obturação, dentes monoradiculares e a técnica de obturação.

Nos parágrafos seguintes encontram-se descritos, de forma sucinta, os principais métodos usados para avaliar a micro-infiltração dos materiais de obturação endodôntica.

1.1 Micro-infiltração com corantes

Este tipo de metodologia é o mais simples de pôr em prática e o custo é baixo, podendo utilizar-se uma grande variedade de corantes como a tinta da Índia, azul de metileno ou eosina, entre outros. A experiência consiste em colocar os dentes obturados num recipiente contendo o corante de modo a que apenas o ápice radicular esteja em contacto com o mesmo. Valendo-se do efeito de capilaridade o corante infiltra-se pelo ápice ao longo da interface formada pelo material obturador e a dentina pericanalar. Posteriormente, a raiz seccionada longitudinalmente e mede-se a distância percorrida pelo corante ao longo do canal [11, 12, 6, 13, 14].

Apesar da simplicidade dos protocolos, este método possui grandes desvantagens, pois o pH, a reactividade química, o tamanho molecular das partículas do corante, assim como a presença de bolhas de ar na interface obturação-dentina podem afetar os resultados. Alguns autores [11, 12] defendem que estas experiências devem ser realizadas num meio com pressão negativa evitando as bolhas de ar. Além disso há alguma controvérsia quanto ao resultado da infiltração, pois acredita-se que os cortes, sejam longitudinais ou transversais podem remover parte do corante, fazendo parecer menor distância que este percorreu [15].

Outros autores optam por técnicas de desmineralização, o que torna a dentina transparente e permite avaliar tri-dimensionalmente a infiltração. Também é possível extrair o corante presente no canal e quantificá-lo através da densidade ótica [15].

Embora não exista consenso sobre este tema entre autores, Wu *et al.* [6] na

sua revisão bibliográfica, defendem que deve haver padronização da técnica de preparação dos canais, o pH dos corantes deve ser controlado e as experiências devem ser efetuadas sob pressão negativa para remover as eventuais bolhas de ar, tal como referido anteriormente. Contudo, concluem que as abordagens quantitativas devem ser preferidas.

1.2 Micro-infiltração com isótopos radioativos

Este tipo de estudo é bastante semelhante à metodologia anterior. Os ápices de dentes obturados são, nesse caso, imersos numa solução que contém um isótopo radioativo ou uma molécula, como a ureia ou lisozima marcada com um isótopo radioativo. Seguidamente um dos seguintes protocolos pode ser usado: o dente é colocado inteiro sobre um filme autoradiográfico ou a raiz pode ser seccionada trasversalmente sendo estes cortes seriados, autoradiografados. Assim é possível determinar a distância percorrida pelo marcador ao longo da dentina periférica ao lúmen do canal [16].

Outra abordagem consiste em isolar as seções e medir quantitativamente o decaimento do isótopos através de um contador gama [17]. E também é possível utilizar um dispositivo de câmara dupla no qual a o marcador radioativo poderá passar da câmara coronal para a câmara apical através a obturação. A partir daí, retirando-se o líquido da câmara apical, quantifica-se a presença do marcador que infiltrou [18].

Tal como nos estudos de infiltração por corantes, tanto a abordagem qualitativa (medir a distância percorrida) como quantitativa (quantidade de isótopo infiltrado) são possíveis no estudo da micro-infiltração por isótopos radioativos. No entanto, parece não haver correlação entre esse dois métodos [16].

1.3 Micro-infiltração com filtração por pressão de fluidos

Este protocolo foi desenvolvido em 1986 por Derkson *et al.* [19] e adaptado por Wu *et al.* [20] para a endodontia com o intuito de quantificar objetivamente a micro-infiltração de fluidos.

Com este protocolo, os ápices dentários preparados são encastrados hermeticamente num tubo. Do lado coronal o tubo contem água enquanto do lado apical contém água e uma bolha de ar. À medida que uma pressão é aplicada no lado coronal, os fluidos vão passar através da interface obturação-dentina e fazer com que a bolha de ar situada na porção apical do tubo se mova, o que permite quantificar a passagem do líquido pelo dente. Os resultados podem ser registados de forma automática, tipicamente em $\mu\text{L}/\text{min}$ e a experiência pode ser conduzida durante extensos períodos de tempo sem necessidade de intervenção do operador [21, 22].

A título comparativo Wu *et al.* [23] usaram este método para remover o ar remanescente em canais obturados e observaram que a penetração do corante azul de metileno era significativamente maior. Noutra experiência, os mesmos autores estes concluíram que existiria a possibilidade de reproduzir resultados com este dispositivo [20].

Esta técnica parecia ser promissora visto que as bolhas de ar não comprometem os resultados, permitindo avaliar o selamento ao longo de todo o canal, as medições são precisas, objectivas e quantitativas [15]. No-entanto, este método, tal como os dois precedentes, permanece sujeito às críticas sobre o tamanho das partículas, porque o fluido utilizado é água.

1.4 Micro-infiltração com bactérias

Visto que as bactérias estão na origem das infeções endodônticas, é implícito que os materiais e técnicas de tratamento devam ter propriedades que evitem a infiltração por estes microrganismos [5].

A abordagem mais frequente é baseada num modelo experimental de câmara dupla, com origem no trabalho desenvolvido por Torabinejad *et al.* [24]. Tipicamente, as coroas de dentes monoradiculares são removidas e as raízes são conservadas para posteriormente, serem preparadas de acordo com a técnica e materiais de tratamento endodôntico objetos de estudo. As raízes são recobertas com verniz teoricamente para impedir qualquer via de infiltração colateral e são inseridas num tubo cónico, do género Eppendorf, sem fundo. Para formar a câmara coronal o espaço entre a raiz e o tubo é isolado com cera colante. Posteriormente esse dispositivo é colocado num tubo de maior diâmetro (ex: tubo de ensaio) que contém um meio de cultura estéril, de modo que a parte exposta da raiz fique em imersa nesse meio. O espaço entre o Eppendorf e tubo de ensaio é fechado, geralmente, com cera colante para isolar o meio estéril de qualquer fonte de contaminação. Este modelo baseia-se no pressuposto que o canal dentário obturado é o único meio de comunicação possível entre as duas câmaras. Assim, quando uma suspensão bacteriana é adicionada na câmara coronal, se ocorrer infiltração, as bactérias conseguirão atingir o meio de cultura estéril da câmara apical, podendo ser detectadas por mudanças de cor do meio [25] ou pela turvação do mesmo [26]. Ver figura I.1.

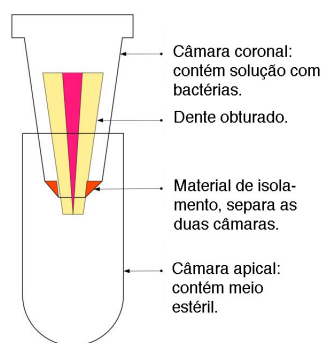


Figura I.1: Esquema ilustrativo de um modelo de câmara dupla convencional.

Embora a metodologia usada pelos diferentes investigadores seja parecida nas suas grandes linhas, existe uma grande discrepância entre resultados o que

Tabela I.1: Resultados dos estudos de infiltração em câmara dupla com *E. Faecalis* após 30 dias:

Referências	Tipo de cimentos				
	R	HC	IV	MTA	OZE
Timpawat <i>et al.</i> [26]	25.00%	58.00%	13.30%		
Oliveira <i>et al.</i> [29]	33.30%	46.66%		61.53%	53.33%
Jacobvitz <i>et al.</i> [30]				0.00%	
Yücel <i>et al.</i> [31]	85.00%	80.00%	85.00%		
McDougall <i>et al.</i> [27]			10.00%		0.00%
Padachey <i>et al.</i> [28]	0.00%		10.00%		

R: Resina; HC: Hidróxido de Cálcio; IV: Inómero de Vidro; MTA: Agregado de Trióxido Mineral; OZE: Óxido de Zinco e Eugenol.

torna a sua comparação difícil. Isto tem gerado controvérsia em relação a estes estudos [20]. A título demonstrativo, na tabela I.1 encontram-se sistematizados alguns estudos que usam *E. faecalis* para comparar a capacidade de selamento de vários cimento endodônticos durante um período de 30 dias. A discordância entre resultados é evidente. Só parece existir concordância nos estudos de McDougall *et al.* [27] e Padachey *et al.* [28] talvez devido ao fato do protocolo ser idêntico.

Segundo os estudos citados [26, 29, 30, 31, 27, 28], parece poder inferir-se que há um grande déficit na capacidade de selamento dos materiais de obturação endodôntica. Contudo, em estudos *in-vivo*, a taxa de sucesso do tratamento endodôntico é grande, o que não seria compatível com estes resultados de infiltração dos materiais, reportados em estudos *in-vitro* de câmara dupla. Por exemplo, no estudo de Toronto [10] 82% dos casos com lesões periapicais prévias ao tratamento endodôntico curaram após o tratamento. A percentagem de sucesso nos casos sem lesões periapicais prévias foi de 93%. Essa discrepância entre a taxa de infiltração / insucesso *in-vitro* e *in-vivo* pode ser devida ao facto de nos modelos de câmara dupla, ser suficiente uma única bactéria atingir a câmara apical estéril para poder proliferar e dar resultado positivo. *In-vivo*, as bactérias que atingem o periápice através do canal dentário obturado, estão sujeitas às defesas imunitárias do hospedeiro e será necessária uma carga bacteriana determinada para causar infeção e os respectivos sinais e sintomas. A dificuldade em quantificar os resultados de infiltração bacteriana por este método impede a correlação com as implicações clínicas, *in-vivo* [32].

Num trabalho de revisão bibliográfica desenvolvido por Rechenberg *et al.* [32], os autores analisaram 67 estudos de infiltração bacteriana em câmara dupla, sugerindo a possibilidade de existir um erro sistemático inerente a este tipo de modelo. A crítica principal a estes estudos é baseada na deficiência de controlos negativos. Os autores Rechenberg *et al.* [32] referem que 57 destes estudos possuem controlos negativos inadequados, quer em número quer em estrutura. Grande parte dos controlos negativos não excluem outras vias de infiltração para além do canal dentário obturado tais como:

- Infiltração entre dente e material que fornece o isolamento entre as duas câmaras;
- Infiltração entre a camada de verniz usada para recobrir os túbulos dentinários e eventuais canais laterais dos dentes;
- Infiltração nos 2 ou 3 milímetros apicais não recobertos por verniz através dos canais laterais ou túbulos dentinários.
- Falta de poder para detectar diferenças estatísticas.

Por estas razões, Rechenberg *et al.* [32] sugerem que os controlos negativos deveriam ser constituídos por dentes íntegros com a coroa dentária em contacto com o material de isolamento. Contudo, este método, não está isento de críticas uma vez que os dentes aparentemente íntegros, podem ter fissuras no esmalte e/ou dentina que permitam a infiltração. Adicionalmente, o número de controlos negativos deveria ser igual ao dos grupos experimentais e por último, a via de infiltração deve ser, em complemento, traçada por meios histológicos.

O modelo de duas câmaras não permite quantificar a infiltração porque, tal como supracitado, a infiltração de um microrganismo é suficiente para dar o resultado como positivo ou infiltrado. A quantificação do número de células num determinado momento dificilmente permite inferir a quantidade de bactérias que conseguiu penetrar a obturação [33]. Rechenberg *et al.* [32] questionam-se se o tipo de mobilidade bacteriana pode influenciar os resultados. Os resultados obtidos por Torabinejad *et al.* [24] sugerem que a mobilidade bacteriana não condiciona a infiltração.

Em 2003, Michalesco & Boudeville [34] tentaram modelizar a infiltração bacteriana com micro-esferas de latex de tamanhos calibrados, tendo concluído que o fator determinante para a penetração bacteriana é o tamanho e a penetração ocorre principalmente por movimentos brownianos e por difusão.

A atividade antimicrobiana dos cimentos endodônticos poderia também influenciar os resultados, mas nas experiências conduzidas por McDougall *et al.* [27] e Padachey *et al.* [28] essa hipótese não se verificou. O trabalho de Slutzky-Goldberg *et al.* [35] demonstrou que nos cimentos testados, as propriedades antimicrobianas são fracas e pouco duradouras, limitando-se ao tempo de presa.

Em 2011, Rechenberg *et al.* [36] conduziram uma experiência de câmara dupla com cera colante como isolante e a bactéria *E. faecalis*. Os resultados mostraram que houve infiltração nos controlos negativos. O fato foi posteriormente confirmado por testes histológicos que provam que o modelo de câmara dupla convencional não permite excluir as outras vias de infiltração.

2 Objetivos do trabalho

O presente trabalho visa o desenvolvimento de um modelo protótipo que permita valorizar os controlos negativos de forma a garantir que a única via de infiltração é o canal dentário. Para obter essa garantia, os dentes humanos foram substituídos por “endo-training blocs” com canais radiculares simulados. Assim

pretende-se anular variáveis inerentes ao uso de dentes humanos que possam condicionar os resultados, como a presença de túbulos dentinários e canais de acessórios os quais estão ausentes no modelo proposto.

Além disso, as amostras que constituem os controlos negativos encontram-se claramente explicitadas, de modo a permitir a reprodutibilidade da experiência, e o seu número é idêntico ao dos grupos experimentais.

II. Materiais and Métodos

Um total de 60 modelos de câmara dupla foram preparados utilizando “Endo-trainers” em substituição de dentes humanos. Os 60 modelos foram divididos em igual número ($n=15$) pelos seguintes grupos: grupo experimental K, grupo experimental T, grupo controlo positivo e grupo controlo negativo.

O canal dentário simulado é obtido a partir de “endo-trainers” (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça) cortados a 1 cm do topo de modo a obter um cubo com a porção reta do canal. Na base do cubo foi feito um pequeno canal para passar uma agulha de seringa. Depois os canais foram instrumentados com a técnica de instrumentação Wave OneTM, lima “primary”, (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça) com o comprimento de trabalho de 10 mm. Durante a instrumentação, procedeu-se à irrigação do canal com uma solução de hipoclorito de sódio a 1%, para remover as lascas de plástico. Posteriormente secou-se o canal com cones de papel e obturaram-se os mesmos, pela técnica de cone único e condensação vertical, utilizando cones de guta percha “primary” Wave OneTM (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça). Nos grupos experimentais, o cimento utilizado no grupo K foi Kerr Pulp Canal Sealer EWT (Kerr Corporation, Orange, CA, USA) e no grupo T foi o TopSeal (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça). Ver tabela II.1. Os cimentos endodônticos foram preparados de acordo com as instruções do fabricante.

Os controlos negativos, foram construídos usando a parte desprovida de canal dos “endo-trainers”. Para tal, cortou-se a base com 1 cm de altura para formar um cubo e com a ajuda de um disco abrasivo desgastaram-se as arestas em bisel para que os cubos encaixassem nas cubetas de plástico; não foi necessário fazer os mesmo para os restantes grupos. Os controlos positivos consistiram em cubos com o canal obturado somente com cones de guta-percha Wave OneTM sem cimento.

Tabela II.1: Controlos e grupos experimentais:

	Controlos		Cimentos	
Tipo	+	-	K	T
Número	15	15	15	15

As duas câmaras são formadas por cubetas de plástico para espectrofotómetro modelo “standard” (Kartell Labware, Noviglio, Itália) com 1 cm de largura. A

câmara apical é constituída por uma cubeta intacta e a câmara coronal é formada por uma peça aberta obtida a partir de uma cubeta cortada a 2 cm do topo. Os cubos formados após a preparação dos “endo-trainers” são inseridos aproximadamente 2 mm numa cubeta intacta e a parte aberta de 2 cm é acoplada ao conjunto, como representado na figura II.1. Todas as respectivas partes são fixas com cola de cianoacrilato (Ceys Plásticos Díficiles, Grupo AC Marca, Barcelona, Espanha) e a mesma cola é injectada nas juntas para colmatar todos os interstícios, com exceção da aresta na câmara apical a partir da qual se pretende injectar o meio de cultura estéril. Uma vez montados os modelos foram deixados a secar durante 24h a temperatura ambiente para serem esterilizados pelo óxido de etileno durante 8h.

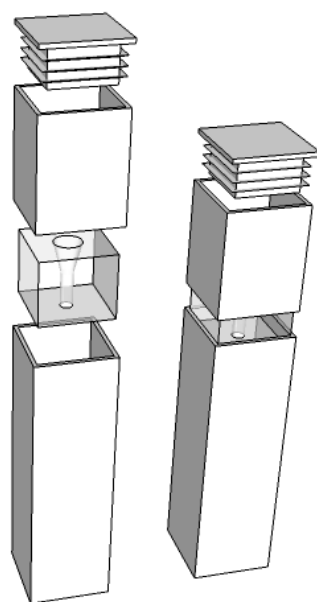


Figura II.1: Modelo experimental: à esquerda uma vista explodida com as diferentes peças constituintes, à direita uma vista com o modelo montado.

Para a colocação do meio de cultura rico *Brain Heart Infusion* (BHI) estéril na câmara apical usou-se uma seringa com uma agulha 21G (Sterican, B. Braun, Melsungen, Alemanha). O meio foi injectado pelo canal previsto para esse efeito numa câmara de fluxo laminar para minimizar qualquer hipótese de contaminação ambiental. Após o total enchimento das câmaras com BHI, estas foram seladas com cola de cianoacrilato (Ceys Plásticos Díficiles, Grupo AC Marca, Barcelona, Espanha).

Adicionalmente, preparou-se uma solução de *Enterococcus faecalis* em BHI com uma turvação de 3 na escala MacFarland. Esta solução continha $2,93 \times 10^9 \pm 8,22 \times 10^8$ unidades formadoras de colónias por ml.

Para iniciar a experiência, colocou-se 100 μL da suspensão bacteriana e 900 μL de BHI estéril nas câmaras coronais, sendo esta fechada com uma tampa. Neste dia inicial (dia 0), foi medido em todos os modelos a turvação da câmara apical a 550 nm para futuras comparações. Nesta fase, os modelos foram colocados numa estufa 37°C dentro de uma caixa fechada, contendo um recipiente com água para evitar a evaporação dos meios de cultura.

Semanalmente os meios presentes nas câmaras coronais foram renovados, removendo-se 900 μL e adicionando-se 900 μL de BHI estéril. Adicionalmente, mediu-se a turvação em todos os modelos usando a a mesma metodologia explicada para o dia 0.

Para verificar a contaminação dos modelos, colocou-se numa cubeta a mesma solução bacteriana que tinha sido colocada nas câmaras coronais e avaliou-se a densidade ótica no dia 0 e após 24h de incubação a 37°C. Calculando a diferença entre o valor inicial 0,084 e final 1,096 estabeleceu-se a variação de densidade a partir da qual se considera a câmara apical dos modelos como infiltrada (1,012).

Para descartar a hipótese de contaminação do meio estéril por outros microrganismos que *E. faecalis*, aspirou-se o meio de cultura da câmara apical, com uma seringa e agulha de 21G (Sterican, B. Braun, Melsungen, Alemanha) aquecida ao rubro de modo perfurar o plástico da câmara apical. Depois, a amostra retirada, foi semeada em placas com agar BHI e incubada em estufa durante 24h a 37°C. Após o período de incubação, verificou-se a similaridade entre colónias e procedeu-se à coloração de Gram dos isolados para verificar a presença de microrganismos diferentes de *E. faecalis*. Caso os exames cultural e microscópico revelassem outros tipos de microrganismos na amostra, era assumido que a turvação era decorrente de contaminação e não de infiltração.

III. Resultados

Após 7 dias de experiência, 15 modelos apresentaram infiltração: 2 controles negativos, 4 controles positivos, 5 do grupo do cimento K e 4 do grupo do cimento T. Ver tabela III.1.

Tabela III.1: Resultados preliminares, infiltração após 7 dias:

Grupos	n	7 dias	
		Infiltração	S/ infiltração
+	15	4(27%)	11(73%)
-	15	2(13%)	13(87%)
K	15	5(33%)	10(67%)
T	15	4(27%)	11(73%)

Ne figura III.1 à direita encontra-se um modelo infiltrado. A cor amarela mais viva é reveladora de crescimento bacteriano na câmara apical. Adicionalmente foi observado um depósito de cor branca no fundo das câmaras inferiores dos modelos infiltrados (não visível na figura III.1).

Nos materiais e métodos a variação de turvação a partir da qual se considerava um modelo como infiltrado foi definida a 1,012. Porém as observações e medições efetuadas ao 7º dia, revelaram que esse valor era demasiado grande. Pois houve alguns modelos nos quais a infiltração era observada a olho e as medições da densidade ótica eram na magnitude de 0,400 a 0,800. A partir da tabela III.2 podemos arbitrariamente baixar esse valor para 0,290 que corresponde ao desvio padrão mais pequeno encontrado nas médias dos modelos infiltrados.

A observação dos meios de cultura das câmaras apicais dos modelos infiltrados revelou exclusivamente microrganismos com uma morfologia do tipo “coccus” gram negativo. O que exclui à partida a hipótese de contaminação ambiental. Todas as observações microscópicas foram compatíveis com a figura III.2.

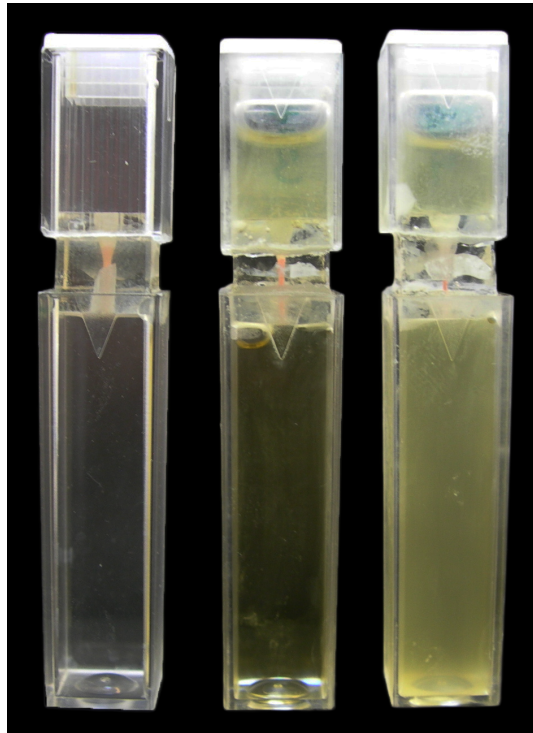


Figura III.1: Da esquerda para à direita: modelo montado sem meios de cultura, modelo com os meios de cultura e modelo infiltrado.

Tabela III.2: Média das densidades óticas medidas no dia 0 no dia 7:

	Dia 0	dia 7
-	$0,061 \pm 0,022$	$0,066 \pm 0,024$
-	$0,042 \pm 0,026$	$0,851 \pm 0,604$
+	$0,056 \pm 0,030$	$0,047 \pm 0,020$
+	$0,065 \pm 0,021$	$1,001 \pm 0,424$
K	$0,023 \pm 0,015$	$0,039 \pm 0,020$
K	$0,041 \pm 0,021$	$1,006 \pm 0,290$
T	$0,051 \pm 0,038$	$0,049 \pm 0,016$
T	$0,037 \pm 0,031$	$0,912 \pm 0,415$

As médias e desvios padrões dos modelos que infiltraram nos 7 dias decorrentes da experiência, encontram-se assinaladas a **vermelho**

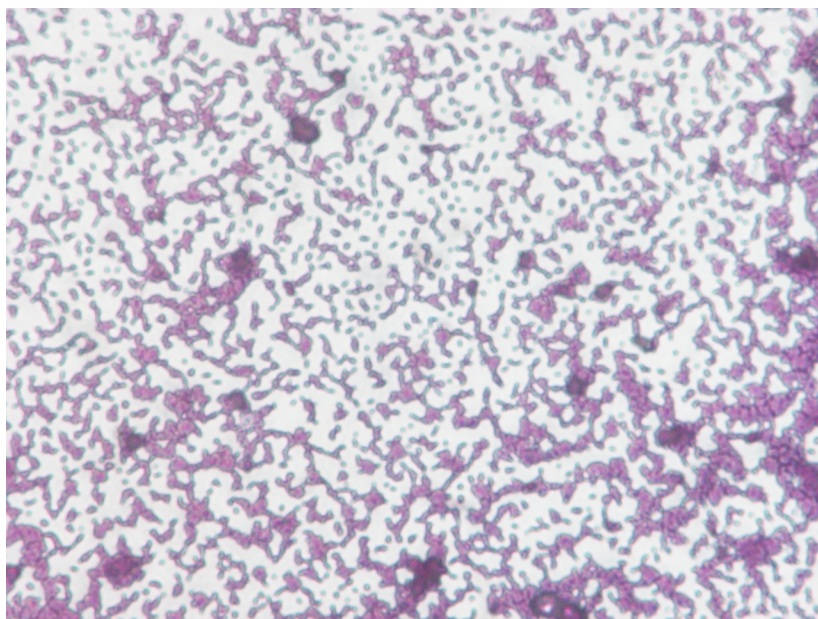


Figura III.2: Imagem microscópica a 400x do esfregaço obtido a partir das câmaras apicais dos modelos infiltrados. Observa-se a presença exclusiva de “coccus” gram negativo

IV. Discussão

Utilizando um modelo de canal simulado em cubo de acrílico (“endo-trainers”), pretendeu-se anular a variabilidade morfológica dos dentes humanos de modo a evitar a discrepância dos resultados, encontrada nos estudos de câmara dupla, pelos quais foi questionada a sua validade. Ao escolher este modelo, tentou-se responder à crítica sobre os controlos negativos inadequados, anulando a possibilidade da infiltração ocorrer por outras vias que não o canal radicular, nomeadamente pelos túbulos dentinários, selados de forma polémica, tornando mais fiável e reproduzível o resultado obtido. O número de controlos negativos também foi idêntico aos experimentais. Assim, este modelo permitiria comparações entre a infiltração através dos diferentes cimentos de obturação, mais objectivas. Além disso, para detectar alguma infiltração grosseira entre as câmaras o modelo foi previamente testado com tinta da Índia, não tendo ocorrido qualquer penetração da mesma ao fim de 7 dias (resultados não apresentados).

No entanto, ao anular as variáveis supracitadas, pomos em causa as interações químicas que existiriam entre os cimentos endodônticos e a dentina os quais poderão conferir um melhor selamento *in-vivo*. Por outro lado, certos cimentos resinosos, como o Topseal, podem ter interações químicas com o composto acrílico do “endo-trainer”, apresentando menor infiltração. Referidas estas limitações, a possibilidade de reproduzir resultados e poder comparar técnicas e materiais de obturação endodôntica com mais objectividade justificaria o uso deste modelo.

Contrariamente ao protocolo elaborado por Torabinejad *et al.* [24], por razões práticas, os “endo-trainers” não se encontravam suspensos no meio de cultura. Deixando a integridade da câmara apical dependente da capacidade de selamento da cola de cianoacrilato e verificou-se que nalguns modelos que havia um leve extravasamento do meio de cultura pela junta de cianoacrilato. Esse facto pode ser explicado pela presença de pequenas bolhas de ar. O aumento da temperatura ambiente devido ao processo de incubação em estufa pode levar ao aumento do volume e da pressão no interior da câmara que, consequentemente, pode comprometer a integridade do selamento. Ao haver contacto do meio de cultura com o meio ambiente é possível que os microrganismos ambientais contaminem a câmara apical. Também foi observado extravasamento do meio de cultura nos controlos negativos infiltrados, podendo assim assumir que se tratou de um erro técnico, passível de ser ultrapassado.

O facto de não se suspender os “endo-trainers” no meio de cultura, implica que a câmara apical tem que estar cheia de meio de cultura para que este esteja em contacto permanente com a porção apical do canal obturado. Se houver uma

falha no selamento o meio pode evaporar e mesmo que bactérias atinjam o ápice, o resultado pode ser um falso negativo. Embora isso não se tenha verificado ao 7º dia em nenhum dos modelos.

Uma das críticas apontadas ao modelo de Torabinejad *et al.* [24] é o facto de se verificar infiltração bacteriana em dentes obturados com cimento e guta, enquanto que a observação histológica, *in-situ*, não identifica nenhuma bactéria isolada na porção apical, quando os canais são obturados adequadamente, mesmo se expostos à cavidade oral por períodos extensos [37, 38].

São apresentadas 2 possíveis explicações para este facto: O modelo de duas câmaras é mais sensível do que a histologia ou há um problema inerente ao modelo de duas câmaras assumindo teoricamente que a infiltração ocorre unicamente através do espaço do canal radicular e não por outras vias. Usando controlos negativos apropriados esta dúvida poderia desaparecer [32].

No presente estudo houve o cuidado de obturar os dentes com cone único (Wave One™) de modo a ter uma boa correspondência com a preparação biomecânica efetuada e cimento. Além disso foi feita condensação vertical de modo a compactar o melhor possível o cone de guta de grande conicidade.

À luz destes resultados preliminares, não podemos tirar conclusões sobre a eficácia dos dois cimentos usados nesta experiência. O curto período de tempo não permite avaliar os comportamentos dos diferentes cimentos, nem mesmo dos controlos positivos, quanto à infiltração bacteriana. Contudo nos períodos de observação dos vários estudos publicados, desde 8 a 364 dias, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os cimentos.

O ênfase do presente estudo deve ser colocado no modelo dos controlos negativos. Apesar de se ter verificado infiltração em dois dos controlos negativos, este resultado não põe em causa a viabilidade deste modelo. Os cubos dos controlos negativos são desprovidos de canais e assim não é de esperar que a infiltração ocorra através do cubo e para as bactérias infiltrarem um controlo negativo tinham que atravessar duas barreiras de cola: a interface cianoacrilato/cubetas que serve para reter o líquido da câmara superior e a interface que sela a câmara inferior. Caso as bactérias conseguissem passar a primeira interface, essas tinham que proliferar entre as duas juntas de cola para poderem infiltrar-se na câmara apical. Tal cenário parece pouco provável. No entanto, se, pelas razões já citadas, os microrganismos contactarem com líquido extravasado, vão poder proliferar e infiltrar a câmara apical pela mesma falha pelo qual o líquido passou.

Assim, podemos especular que o mais provável é ter-se tratado de erro técnico ou contaminação. Pelo exposto, podemos concluir que o modelo é válido, necessitando ainda de ser melhorado de forma a não deixar a integridade da câmara inferior dependente de qualquer tipo de colas, uma vez que estes materiais podem estar sujeitos aos mesmo problemas de infiltração que os materiais de obturação endodôntica. Para já o nosso modelo não é ainda totalmente seguro para responder às críticas de Rechenberg *et al.* [32] mas permite justificar as supostas vantagens da substituição de dentes humanos por "endo-trainers", com controlos adequados e identificação dos microrganismos da câmara apical.

V. Bibliografia

- [1] Miller WD. An Introduction to the Study of the Bacterio-pathology of the Dental Pulp. Dental Cosmos. 1894;36:505–528.
- [2] Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1965 Sep;20:340–349.
- [3] Siqueira JF. Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. Int Endod J. 2001 Jan;34(1):1–10.
- [4] Siqueira JF, Rocas IN. Distinctive features of the microbiota associated with different forms of apical periodontitis. J Oral Microbiol. 2009;1.
- [5] Johnson WT, Kulild JC. Obturation of the Cleaned and Shaped Root Canal System. In: Cohen S, Hargreaves KM, editors. Pathways of the Pulp. 10th ed. St. Louis, Mo.: Mosby Elsevier; 2011. p. 349–352.
- [6] Wu MK, Wesselink PR. Endodontic leakage studies reconsidered. Part I. Methodology, application and relevance. Int Endod J. 1993 Jan;26(1):37–43.
- [7] Ingle JJ. In: Endodontics. 5th ed. Hamilton, Ontario: BC Decker; 2002. p. 748–757.
- [8] Dow PR, Ingle JJ. Isotope determination of root canal failure. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1955 Oct;8(10):1100–1104.
- [9] Fabricius L, Dahlen G, Sundqvist G, Happonen RP, Moller AJ. Influence of residual bacteria on periapical tissue healing after chemomechanical treatment and root filling of experimentally infected monkey teeth. Eur J Oral Sci. 2006 Aug;114(4):278–285.
- [10] de Chevigny C, Dao TT, Basrani BR, Marquis V, Farzaneh M, Abitbol S, et al. Treatment outcome in endodontics: the Toronto study–phase 4: initial treatment. J Endod. 2008 Mar;34(3):258–263.
- [11] Spangberg LS, Acierno TG, Yongbum Cha B. Influence of entrapped air on the accuracy of leakage studies using dye penetration methods. J Endod. 1989 Nov;15(11):548–551.

- [12] Plotino G, Grande NM, Manzulli N, Chiaradia G, La Torre G, Somma F. Influence of reduced air pressure methods on dye penetration in standardized voids. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007 Feb;103(2):289–294.
- [13] Ahlberg KM, Assavanop P, Tay WM. A comparison of the apical dye penetration patterns shown by methylene blue and india ink in root-filled teeth. *Int Endod J.* 1995 Jan;28(1):30–34.
- [14] Kersten HW, Moorers WR. Particles and molecules in endodontic leakage. *Int Endod J.* 1989 May;22(3):118–124.
- [15] Verissimo DM, do Vale MS. Methodologies for assessment of apical and coronal leakage of endodontic filling materials: a critical review. *J Oral Sci.* 2006 Sep;48(3):93–98.
- [16] Ximenez-Fyvie LA, Ximenez-Garcia C, Carter-Bartlett PM, Collado-Webber FJ. Accuracy of endodontic microleakage results: autoradiographic vs. volumetric measurements. *J Endod.* 1996 Jun;22(6):294–297.
- [17] Haikel Y, Freymann M, Fanti V, Claisse A, Poumier F, Watson M. Apical microleakage of radiolabeled lysozyme over time in three techniques of root canal obturation. *J Endod.* 2000 Mar;26(3):148–152.
- [18] Danin J, Linder L, Sund ML, Stromberg T, Torstenson B, Zetterqvist L. Quantitative radioactive analysis of microleakage of four different retrograde fillings. *Int Endod J.* 1992 Jul;25(4):183–188.
- [19] Derkson GD, Pashley DH, Derkson ME. Microleakage measurement of selected restorative materials: A new in vitro method. *The Journal of Prosthetic Dentistry.* 1986;56(4):435 – 440.
- [20] Wu MK, De Gee AJ, Wesselink PR, Moorers WR. Fluid transport and bacterial penetration along root canal fillings. *Int Endod J.* 1993 Jul;26(4):203–208.
- [21] Sagsen B, Er O, Kahraman Y, Orucoglu H. Evaluation of microleakage of roots filled with different techniques with a computerized fluid filtration technique. *J Endod.* 2006 Dec;32(12):1168–1170.
- [22] Garip H, Garip Y, Orucoglu H, Hatipoglu S. Effect of the angle of apical resection on apical leakage, measured with a computerized fluid filtration device. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2011 Mar;111(3):e50–55.
- [23] Wu MK, De Gee AJ, Wesselink PR. Fluid transport and dye penetration along root canal fillings. *Int Endod J.* 1994 Sep;27(5):233–238.
- [24] Torabinejad M, Ung B, Kettering JD. In vitro bacterial penetration of coronally unsealed endodontically treated teeth. *Journal of Endodontics.* 1990;16(12):566 – 569.

- [25] Torabinejad M, Rastegar AF, Kettering JD, Pitt Ford TR. Bacterial leakage of mineral trioxide aggregate as a root-end filling material. *J Endod.* 1995 Mar;21(3):109–112.
- [26] Timpawat S, Amornchat C, rong Trisuwan W. Bacterial Coronal Leakage after Obturation with Three Root Canal Sealers. *Journal of Endodontics.* 2001;27(1):36 – 39.
- [27] McDougall IG, Patel V, Santerre P, Friedman S. Resistance of experimental glass ionomer cement sealers to bacterial penetration in vitro. *J Endod.* 1999 Nov;25(11):739–742.
- [28] Padachey N, Patel V, Santerre P, Cvitkovitch D, Lawrence HP, Friedman S. Resistance of a Novel Root Canal Sealer to Bacterial Ingress In Vitro. *Journal of Endodontics.* 2000;26(11):656 – 659.
- [29] Oliveira AC, Tanomaru JM, Faria-Junior N, Tanomaru-Filho M. Bacterial leakage in root canals filled with conventional and MTA-based sealers. *Int Endod J.* 2011 Apr;44(4):370–375.
- [30] Jacobovitz M, Vianna ME, Pandolfelli VC, Oliveira IR, Rossetto HL, Gomes BPFA. Root canal filling with cements based on mineral aggregates: an in vitro analysis of bacterial microleakage. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology.* 2009;108(1):140 – 144.
- [31] Yucel AC, Guler E, Guler AU, Ertas E. Bacterial penetration after obturation with four different root canal sealers. *J Endod.* 2006 Sep;32(9):890–893.
- [32] Rechenberg DK, De-Deus G, Zehnder M. Potential systematic error in laboratory experiments on microbial leakage through filled root canals: review of published articles. *Int Endod J.* 2011 Mar;44(3):183–194.
- [33] Barthel CR, Strobach A, Briedigkeit H, Gobel UB, Roulet JF. Leakage in roots coronally sealed with different temporary fillings. *J Endod.* 1999 Nov;25(11):731–734.
- [34] Michalesco P, Boudeville P. Calibrated latex microspheres percolation: a possible route to model endodontic bacterial leakage. *J Endod.* 2003 Jul;29(7):456–462.
- [35] Slutzky-Goldberg I, Slutzky H, Solomonov M, Moshonov J, Weiss EI, Matalon S. Antibacterial properties of four endodontic sealers. *J Endod.* 2008 Jun;34(6):735–738.
- [36] Rechenberg DK, Thurnheer T, Zehnder M. Potential systematic error in laboratory experiments on microbial leakage through filled root canals: an experimental study. *Int Endod J.* 2011 Sep;44(9):827–835.
- [37] Ricucci D, Bergenholtz G. Bacterial status in root-filled teeth exposed to the oral environment by loss of restoration and fracture or caries—a histobacteriological study of treated cases. *Int Endod J.* 2003 Nov;36(11):787–802.

- [38] Ricucci D, Lin LM, Spangberg LS. Wound healing of apical tissues after root canal therapy: a long-term clinical, radiographic, and histopathologic observation study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009 Oct;108(4):609–621.

VI. Agradecimentos

*À Excelentíssima Senhora Professora Irene Graça Azevedo
Pina Vaz*

*À Excelentíssima Senhora Professora Maria Benedita
Almeida Garrett de Sampaio Maia*

*Ao Corpo Docente da Faculdade de Medicina Dentária da
Universidade do Porto*

Aos Meus Pais

Ao meu irmão

Aos Meus Amigos e Colegas