

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 18/12/2025.

DANIELA ALVIM CHRISOSTOMO

**Estudo *in vitro* de técnicas de instrumentação mecanizada e
medicações intracanaís como propostas de protocolos para
pulpectomia em dentes decíduos**

Araçatuba-SP

2023

DANIELA ALVIM CHRISOSTOMO

**Estudo *in vitro* de técnicas de instrumentação mecanizada e
medicações intracanaís como propostas de protocolos para
pulpectomia em dentes decíduos**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Araçatuba, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências, área de concentração Saúde Bucal da Criança.

Orientadora: Profa. Dra. Cristiane Duque

Coorientadores: Profa. Dra. Marcelle Danelon

Prof. Dr. Alberto Carlos Botazzo Delbem

Araçatuba-SP

2023

Catálogo-na-Publicação

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

C554e Chrisostomo, Daniela Alvim.
Estudo in vitro de técnicas de instrumentação mecanizada e
medicações intracanaís como propostas de protocolos para
pulpectomia em dentes decíduos / Daniela Alvim Chrisostomo. -
Araçatuba, 2023
100 f. : il. ; tab.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Odontologia de Araçatuba

Orientadora: Profa. Cristiane Duque

Coorientadora: Profa. Marcelle Danelon

Coorientador: Prof. Alberto Carlos Botazzo Delbem

1. Pulpectomia 2. Instrumentos odontológicos 3. Antibacte-
rianos 4. Anti-infecciosos 5. Biofilmes 6. Metaloproteases
7. Dente decíduo I. T.

Black D27
CDD 617.645

Aos meus pais

Dedico completamente este trabalho aos meus pais, José Carlos e Angela, que estão sempre presentes em minha vida e nunca mediram esforços para que eu levasse adiante meus estudos. Sempre me apoiaram em todas as minhas decisões e com todo amor, carinho e bondade, me ensinaram a ser quem sou hoje. Vocês são tudo para mim. Eu amo vocês. Gratidão eterna!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus**, por me dar forças e sabedoria para alcançar todos os meus objetivos da melhor forma possível.

Agradeço de forma especial aos **meus pais**, José Carlos e Angela, por serem tudo nessa vida para mim; por torcerem por mim todos os dias e vibrarem com cada conquista minha.

Agradeço aos **meus irmãos** Bruno, Fernanda e Fábio, por confiarem em mim e estarem ao meu lado em todos os momentos da vida. Em especial minha irmã Fernanda, por não me deixar desistir de nenhuma oportunidade que me apareceu durante essa fase de doutorado, sempre confiando em mim e no meu potencial.

Agradeço ao **meu noivo** Pedro Ivo, por toda paciência, carinho, incentivo e companheirismo em todos esses anos que estamos juntos.

Agradeço a minha **sogra** Amelinha por toda ajuda e suporte que me deu durante meu doutorado, sendo sempre muito carinhosa comigo.

Agradeço ao **meu Avô Oscar** (in memoriam) e ao **meu tio José Carlos** (in memoriam) por sempre torcerem por mim. Tenho certeza de que continuam vibrando com todas as minhas conquistas.

Agradeço as minhas **avós**, em especial a **avó materna** Juracy, por sempre acreditar no meu potencial e dizer que sou capaz.

Agradeço a minha **orientadora e amiga** Cristiane Duque, por sempre ser tão prestativa, atenciosa e carinhosa. Obrigada por todo conhecimento que me transmitiu, pelo incentivo, por cada palavra de carinho e por ser exatamente quem você é, uma pessoa do bem, que ama o que faz e ama os seus alunos. Que sorte a minha ter você como orientadora! Sorte ainda maior te ter como amiga! Obrigada pela sua amizade e por todos esses anos juntas. Que nossa amizade prevaleça para sempre!

Agradeço aos meus coorientadores, Marcelle Danelon e Alberto Carlos Botazzo Delbem, por todo apoio nesse projeto.

Agradeço aos **professores** João Eduardo Gomes Filho, Anuradha Prakki, Jackeline Gallo do Amaral e Anna Carolina Volpi, por terem se disponibilizado para serem minha banca e estarem presentes neste dia tão importante pra mim. Agradeço em especial a professora Anuradha, por ter sido minha orientadora durante meu doutorado sanduíche no exterior, sendo sempre muito carinhosa e atenciosa comigo.

Agradeço ao meu **amigo** Jesse, por toda paciência, carinho e companheirismo durante esses 3 anos de doutorado. Gratidão eterna por tudo que fez por mim!

Agradeço a essa **Instituição (UNESP-FOA)** pelo excelente ambiente oferecido aos alunos e pelos profissionais qualificados que disponibiliza para nos ensinar.

Agradeço ao **Curso de Pós-graduação em Ciências** da Faculdade de Odontologia de Araçatuba- UNESP, na pessoa do coordenador Prof. Adj. Juliano Pelim Pessan.

Agradeço a **CapesPrint** (#88887.695821/2022-00) pela oportunidade de realizar meu doutorado sanduíche no exterior na University of Toronto. Foi a melhor experiência da minha vida.

Agradeço a **Capes** pelo financiamento com minha pesquisa. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

“Não sabendo que era impossível, foi lá e fez.”

Jean Cocteau

CHRISOSTOMO, DA. **Estudo *in vitro* de técnicas de instrumentação mecanizada e medicações intracanaís como propostas de protocolos para pulpectomia em dentes decíduos**. 2023. 50 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2023.

RESUMO GERAL

Esta tese foi dividida em 2 artigos científicos. O artigo 1 teve como objetivo comparar dois protocolos de instrumentação endodôntica com limas rotatórias ou com limas reciprocantes, realizados em protótipos de molares decíduos por meio de microtomografia computadorizada (micro-CT); e o artigo 2 teve como objetivo avaliar o efeito de duas propostas de medicações intracanaís: combinação triantibiótica (TRI) de metronidazol, ciprofloxacina e fosfomicina (FOSFO), e a associação de epigallocatequina-3-galato (EGCG) com FOSFO, em comparação com os controles pasta de hidróxido de cálcio (CH) ou clorexidina (CHX), todos dissolvidos em polietilenoglicol-400 (PEG) em biofilmes multiespécies, toxicidade em fibroblastos e atividades colagenolíticas e gelatinolíticas detectadas na dentina radicular. Para a metodologia do artigo 1 foram utilizados 24 protótipos impressos em 3D de molares decíduos artificiais que foram distribuídos em dois grupos de 12 cada, de acordo com o tipo de instrumentação: com limas rotatórias Sequence Baby File NiTi© (SBF) ou limas reciprocantes com limas X1-Blue File NiTi© (XBF). Foram avaliados os parâmetros: volumes do canal radicular e da dentina, transporte e centralização do canal, risco de perfuração radicular e tempo de instrumentação. Para a metodologia do artigo 2, o efeito antibiofilme e a citotoxicidade de medicamentos contendo combinação de antibióticos, EGCG+FOSFO ou CH foram avaliados em biofilmes multiespécies formados em amostras de dentina radicular por microscopia confocal e em células de fibroblastos por ensaios de resazurina, respectivamente. A inibição da atividade das proteases por medicamentos foi medida por ensaios de atividade enzimática colagenolítica (ELISA) e atividade gelatinolítica por metaloproteinases - MMP com zimografia *in situ* em espécimes de dentina radicular. Os resultados do artigo 1 mostraram que o SBF promoveu menor alargamento do canal radicular e conseqüentemente removeu menos dentina quando comparado ao sistema reciprocante. De modo geral, ambos os protocolos de instrumentação não apresentaram diferença estatística entre si considerando o transporte do canal radicular e a capacidade de centralização. Não houve diferença na espessura da

dentina, fraturas e fissuras comparando os momentos pré e pós-operatórios para ambos os sistemas endodônticos. O tempo de instrumentação foi menor para XBF. Os resultados do artigo 2 mostraram que EGCG+FOSFO, combinação de antibióticos e CH em PEG 400 reduziram significativamente as bactérias dos biofilmes multiespécies nos túbulos dentinários e em concentrações mais baixas não foram tóxicos para os fibroblastos. Todos os medicamentos apresentaram atividade anticolagenolítica em comparação ao PEG e à água. PEG+CH e PEG+CHX diminuíram a atividade gelatinolítica *in situ* da MMP quando comparado ao controle sem tratamento. PEG+TRI aumentou a atividade gelatinolítica na dentina radicular. Concluindo, ambos os protocolos de instrumentação endodôntica foram seguros para serem utilizados em pulpectomia de dentes decíduos, pois promoveram mínima redução do volume dentinário, transporte e descentralização do canal, e consequentemente amenizaram alterações na espessura dentinária e as possibilidades de fraturas. Embora o tempo de instrumentação tenha sido menor para o sistema recíprocante, ele causou maior aumento no volume do canal. EGCG+FOSFO contidos no PEG-400 apresentou propriedades antibiofilme e anticolagenolíticas, além de baixa citotoxicidade em concentrações mais baixas, podendo ser uma alternativa de medicação intracanal para fins endodônticos.

Palavras-chaves: Pulpectomia. Instrumentos odontológicos. Antibacterianos. Anti-infecciosos. Biofilme. Metaloproteinases. Dentes decíduos.

CHRISOSTOMO, DA. ***In vitro* study of mechanized instrumentation techniques and intracanal medications as protocols proposed for pulpectomy in primary teeth.** 2023. 50 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2023.

GENERAL ABSTRACT

This thesis was divided into 2 scientific articles. The article 1 aimed to compare two endodontic instrumentation protocols with rotary or reciprocating files, performed on prototypes of primary molars using microcomputed tomography (micro-CT); and article 2 aimed to evaluate the effect of two proposed intracanal medications: triantibiotic combination (TRI) of metronidazole, ciprofloxacin and fosfomicin (FOSFO) and the association of epigallocatechin gallate (EGCG) with FOSFO, in comparison with the controls calcium hydroxide paste (CH) or chlorhexidine (CHX), all dissolved in polyethylene glycol 400 (PEG) in multispecies biofilms, toxicity in fibroblasts and collagenolytic and gelatinolytic activities detected in root dentin. For the methodology of article 1, 24 3D printed prototypes of artificial deciduous molars were used, which were distributed into two groups of 12 each, according to the type of instrumentation: with Sequence Baby NiTi files© (SBF) rotary files or reciprocating files with X1-Blue File NiTi© (XBF). The following parameters were evaluated: root canal and dentin volumes, canal transportation and centralization, risk of root perforation and instrumentation time. For the methodology of article 2, the antibiofilm effect and cytotoxicity of drugs containing a combination of antibiotics, EGCG+FOSFO or CH were evaluated in multispecies biofilms formed in root dentin samples by confocal microscopy and in fibroblast cells by resazurin assays, respectively. Inhibition of protease activity by drugs was measured by collagenolytic enzyme activity assays (ELISA) and gelatinolytic activity by metalloproteinases - MMP with *in situ* zymography in radicular dentin specimens. The results of article 1 showed that SBF promoted less enlargement of the root canal and consequently removed less dentin when compared to the reciprocating system. In general, both instrumentation protocols showed no statistical difference between them considering root canal transport and centralization capacity. There was no difference in dentin thickness, fractures and fissures comparing the pre- and postoperative moments for both endodontic systems. Instrumentation time was shorter for XBF. The

results of article 2 showed that EGCG+FOSFO, combination of antibiotics and CH in PEG 400 significantly reduced bacteria from multispecies biofilms in dentinal tubules and at lower concentrations were not toxic to fibroblasts. All drugs showed anticollagenolytic activity compared to PEG and water. PEG+CH and PEG+CHX decreased the *in situ* gelatinolytic activity of MMP when compared to the untreated control. PEG+TRI increased gelatinolytic activity in root dentin. In conclusion, both endodontic instrumentation protocols were safe to be used in pulpectomy of primary teeth, as they promoted a minimum reduction in dentin volume, transport and decentralization of the canal, and consequently mitigated changes in dentin thickness and the possibility of fractures. Although instrumentation time was shorter for the reciprocating system, it caused a greater increase in canal volume. EGCG+FOSFO contained in PEG-400 showed antibiofilm and anticollagenolytic properties, in addition to low cytotoxicity at lower concentrations, and could be an alternative intracanal medication for endodontic purposes.

Keywords: Pulpectomy. Dental Instruments. Antibacterial. Anti-infectives. Biofilm. Metalloproteinases. Deciduous teeth.

LISTA DE FIGURAS

Article 1: Root canal instrumentation of primary teeth with rotary and reciprocating files: a micro-computed tomography analysis

Figure 1 - Representative micro-CT images of teeth before and after instrumentation with rotary and reciprocating files 26

Figure 2 - Representative micro-CT cross sections of the middle third of the root, taken from the mesial root canals of mandibular molar, showing the shortest distance between the edge of the root and the canal, determined to perform the analyses of transportation and centralization in each canal..... 27

Figure 3 - Representative micro-CT images of fractures and cracks detected after instrumentation with rotary and reciprocating systems..... 33

LISTA DE TABELAS

Article 1: Root canal instrumentation of primary teeth with rotary and reciprocating files: a micro-computed tomography analysis

Table 1 - Increase in root canal volume (%) and decrease in dentin volume (%) after instrumentation with rotary (SBF) and reciprocating (XBF) files.....29

Table 2 - Root canal transportation and ability of centralization after instrumentation with rotary (SBF) and reciprocating (XBF) files..... 30

Table 3 - Dentin thickness (mm) in the inner side of canals before and after instrumentation with rotary (SBF) and reciprocating (XBF) files.....31

Table 4 - Time of Instrumentation, fractures and cracks detected after instrumentation with rotary (SBF) and reciprocating (XBF) files..... 33

LISTA DE FIGURAS

Article 2: Antibiofilm properties, cytotoxicity, and effect on protease activity of antibiotics and EGCG-based medications for endodontic purposes

Figure 1 - Representative confocal laser scanning microscopy images of bovine root dentin specimens contaminated for 14 days with multispecies biofilms and treated for 48h	55
Figure 2 - Representative confocal laser scanning microscopy images of bovine root dentin specimens contaminated for 14 days with multispecies biofilms and treated for 7 days	56
Figure 3 - Fibroblast viability after 24 h of exposure to dilutions (D1:25, D1:50, D1:100, D1:150 and D1:200) of medications	57
Figure 4 - Dentin collagen degradation determined by quantification of solubilized C-terminal telopeptides (ICTP and CTX) and N-terminal telopeptides (NTX)	58
Figure 5 - Effect of IMs on dentin MMP inhibition by <i>in situ</i> zymography	59

SUMÁRIO

Introdução Geral	16
-------------------------	-----------

Article 1 - Root canal instrumentation of primary teeth with rotary and reciprocating files: a micro-computed tomography analysis

Abstract	21
1. Introduction	22
2. Material and methods	24
2.1. Teeth preparation and instrumentation methods	24
2.2. Microcomputed Tomography (micro-CT) acquisition	25
2.3. Measurement of root canal and dentin volume	25
2.4. Measurement of root canal transportation (RCT) and centralization (CA)	27
2.5. Measurement of risk of root perforation	28
2.6. Statistical analysis	28
3. Results	28
4. Discussion	33
Funding	37
References	38

Article 2 - Antibiofilm properties, cytotoxicity, and effect on protease activity of antibiotics and EGCG-based medications for endodontic purposes

Abstract	46
1. Introduction	47
2. Materials and methods	49
2.1. Preparation of IMs	49
2.2. Biofilm assays in radicular dentin and confocal microscopy	50
2.2.1. Microbial strains and growth conditions	50
2.2.2. Biofilms assays and confocal laser scanning microscopy (CLSM)	50
2.3. Effect of medications on fibroblast viability	51
2.4. Collagenolytic enzyme activity assays	52
2.4.1. Preparation of demineralized dentin samples	52
2.4.2. Total protein and solubilized telopeptide assays	52
2.5. Analysis of MMPs activity <i>in situ</i> zymography	53
2.5.1. Samples and root canal preparation	53
2.5.2. <i>In situ</i> zymography	53
2.6. Statistical Analysis	54

3. Results	54
3.1. Inhibition of multispecies biofilms in radicular dentin by medications	54
3.2. Effect of medications on fibroblast viability	56
3.3. Effect of IMs on collagenolytic activity	57
3.4. Effect on MMPs activity by IMs	58
4. Discussion	60
Funding	63
References	64
ANEXOS	77
ANEXO 1 – Minimal inhibitory concentration (MIC) and Minimal bactericidal concentration (MBC) values	77
ANEXO 2 - CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals	78
ANEXO 3 – Research Human Ethics Committee	79
ANEXO 4 - Author Guidelines – International Endodontic Journal – Article 1.	82
ANEXO 5 - Author Guidelines – Dental Materials – Article 2.	92
Conclusão Geral	72
Referências da Introdução Geral	73

Introdução Geral

Embora no contexto de saúde bucal, a educação e a prevenção são prioritárias na Odontologia Contemporânea, as alterações pulpare que acometem os dentes decíduos em função de lesões de cárie ou por motivos traumáticos ainda são muito frequentes, necessitando, muitas vezes, de tratamento endodôntico. O principal objetivo da endodontia na Odontopediatria é manter o dente decíduo na cavidade bucal até o momento de sua esfoliação fisiológica, retornando à sua função biológica, ou seja, mastigatória, fonética, estética, entre outras, com a regressão dos sinais e sintomas clínicos e radiográficos (AAPD, 2014; Smaïl et al., 2018) ressaltando ainda que a permanência destes também atuará como guia para a erupção dos dentes permanentes sucessores (Nascimento et al., 2014).

A pulpectomia é o procedimento endodôntico mais indicado em Odontopediatria para o tratamento dos tecidos pulpare infectados, ou seja, para dentes com diagnóstico de pulpite irreversível. Consiste na remoção total do tecido pulpar coronário e radicular por meio do preparo biomecânico (instrumentação e irrigação), uso de medicação intracanal e posterior obturação dos canais radiculares (AAPD, 2014). Entretanto, a instrumentação dos canais de dentes decíduos é considerada um desafio por estes dentes serem anatomicamente mais complexos do que os de dentes permanentes pela presença de áreas de rizólise, menor espessura de dentina em área de furca, curvatura acentuada das raízes, principalmente em molares superiores, além da questão do tempo de colaboração das crianças ser bem mais reduzido que em adultos (Duque et al., 2013; Ozcan et al., 2016).

Dessa forma, novos métodos de preparo dos canais radiculares em dentes decíduos estão sendo estudados visando reduzir o número de limas, bem como o tempo do procedimento de instrumentação em si (Prabhakar et al., 2016). Alguns pesquisadores estudaram a endodontia mecanizada direcionada ao tratamento de crianças, porém a maioria dos estudos se concentra ainda em experimentos laboratoriais (Kummer et al., 2008; Moghaddam et al., 2009; Katge et al., 2016; Kaya et al., 2017; Moraes et al., 2019; Souza et al., 2023). Kummer et al. (2008) compararam limas manuais e rotatórias com objetivo de verificar o desgaste de dentina, risco de perfuração e tempo do preparo dos canais. De acordo com os dados obtidos, o desgaste em dentina no terço coronal e médio foi maior com as limas manuais, e o tempo de instrumentação foi menor para as limas rotatórias e estas também promoveram maior regularidade nos canais radiculares. Quanto

às perfurações radiculares devido à instrumentação, não houve diferença significativa entre os grupos.

O principal objetivo do preparo biomecânico deve ser a eliminação dos microrganismos e a prevenção de reinfecção nos canais radiculares. Para atingir esse objetivo, deve-se fazer a combinação da instrumentação com limas mais rápidas e seguras e a irrigação com soluções antimicrobianas efetivas. Diversos estudos têm avaliado a capacidade desinfetante de agentes químicos altamente concentrados, como hipoclorito de sódio ou associação de agentes como hipoclorito de sódio e ácido cítrico como soluções irrigantes em endodontia para dentes decíduos (Salama et al., 1994; Götze et al., 2005; Tannure et al., 2011). Entretanto, devido à complexidade da malha de canais secundários e acessórios, ainda há persistência de algumas espécies microbianas após o preparo químico-mecânico impossibilitando a total desinfecção do sistema de canais radiculares, o que leva à necessidade do uso de medicação intracanal (Chávez et al., 2003). Idealmente, a medicação intracanal deve apresentar uma boa ação antibacteriana, para que a sua permanência no interior do canal radicular tenha maiores chances de atingir áreas não alcançadas pela instrumentação, como istmos, ramificações, reentrâncias e túbulos dentinários; potencializando assim a sanificação do sistema de canais e túbulos dentinários e impedindo que os microrganismos proliferem no intervalo entre as sessões de tratamento (Byström et al., 1985, 1987; Sjögren et al., 1991).

Bactérias gram-negativas, membros comuns das infecções primárias, são geralmente eliminadas após procedimento de tratamento químico-mecânico. Exceções podem incluir alguns bacilos anaeróbios como *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella species* e *Campylobacter rectus*, que estão entre as espécies encontradas em amostras após instrumentação/medicação endodôntica. Entretanto, a maioria dos estudos tem revelado que as bactérias gram-positivas são as mais frequentemente presentes nestes casos, incluindo estreptococos (*S. mitis*, *S. gordonii*, *S. anginosus*, *S. sanguinis*, *S. oralis*), *P. micra*, *Actinomyces species* (*A. israelii* e *A. odontolyticus*), *Propionibacterium species* (*P. acnes* e *P. propionicum*), *P. alactolyticus*, lactobacilos (*L. paracasei*, *L. acidophilus*), *Enterococcus faecalis*, entre outros (Siqueira e Rôças, 2009).

Dentre as medicações intracanaís frequentemente utilizadas destaca-se a pasta de hidróxido de cálcio, indicada por seu efeito antimicrobiano e potencial para estimular o reparo dos tecidos periapicais. A pasta Calen® (SS White, RJ, Brasil) que apresenta em sua composição 2,5g de hidróxido de cálcio, 0,5g de óxido de zinco, 0,05g de colofônia

hidrogenada, 1,75mL de polietilenoglicol 400 (PEG 400, como veículo) tem sido usada para diversas finalidades, como curativos de demora entre sessões de pulpectomia e inclusive como material obturador em dentes decíduos por sua boa tolerância pelos tecidos, natureza hidrossolúvel e baixa solubilidade (Ranly e Garcia, 2000).

Antimicrobianos naturais ou sintéticos estão sendo empregados como alternativas às medicações intracanaais tradicionais, com o intuito de eliminar as bactérias e suas toxinas e não agredir os tecidos periapicais adjacentes (Iglesias et al., 2013; Moreno et al., 2014). Sato *et al.* (1993) e Hoshino et al. (1996) foram os primeiros investigadores a avaliarem a pasta triantibiótica contendo metronidazol, ciprofloxacina e minociclina. Estudo analisou a eficácia antibacteriana destes antibióticos isoladamente e em combinação contra bactérias isoladas de dentina infectada, polpas infectadas e periodontite apical e observou que nenhum deles sozinho eliminou todas as bactérias, mas em combinação foram suficientemente potentes para erradicar as bactérias em todas as amostras (Hoshino et al., 1996). O metronidazol é um composto nitroimidazol que exibe ampla atividade antiprotozoária, antibacteriana contra bacilos Gram-negativos anaeróbios, bacilos Gram-positivos esporulados e cocos anaeróbios. A ciprofloxacina é uma fluoroquinolona que apresenta ação bactericida, principalmente contra Gram-negativas (Vijayaraghavan et al., 2012). A minociclina, um antibiótico da família das tetraciclina, apesar do seu grande potencial bactericida, pode causar alergias e manchamento da coroa dentária (Kim et al., 2010). Essas limitações da minociclina levou ao estudo de novas alternativas para a combinação da pasta triantibiótica, como a fosfomicina, um potente inibidor da proteína MurA, envolvida na biogênese da parede celular, com amplo espectro de ação contra bactérias Gram positivas e Gram negativas (Trope, 2010). Estudo apontou que a combinação de metronidazol, ciprofloxacina e fosfomicina apresentou efeito inibitório *in vitro* contra diversas cepas microbianas, incluindo *E. faecalis*, e atividade antibiofilme simples e misto de *E. faecalis* e *C. albicans* (Machado, 2016)

Entre os antimicrobianos naturais que vêm sendo muito estudados em Medicina e Odontologia está o epigallocatequina-3-galato (EGCG), um importante flavonoide extraído das folhas de chá verde (Reygaert WC, 2018; Steinmann et al., 2013). Além de apresentar propriedades antioxidantes, antitumorais e anti-inflamatórias, o EGCG também é eficaz contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Steinmann et al, 2013). Também se mostrou eficaz contra bactérias multirresistentes, como *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* (Jeon et al., 2014). EGCG demonstrou atividade inibitória

contra *Enterococcus faecalis*, tanto em células planctônicas quanto em biofilme (Lee e Tan, 2015) e inibiu a adesão de *Streptococcus mutans* de maneira dose-dependente por meio da supressão de genes relacionados à formação de biofilme (Xu et al., 2012). Estudos demonstraram que baixas concentrações de EGCG mostram sinergismo com antibióticos β -lactâmicos sobre bactérias multirresistentes, provavelmente porque EGCG atua direta ou indiretamente no mesmo local dos antibióticos, o peptidoglicano nas paredes celulares, aumentando a atividade antimicrobiana (Zhao et al., 2001). Além disso, a combinação de antibióticos com EGCG aumentou o efeito sobre biofilmes orais (Hu et al., 2001; Duque et al., 2023). Ferreira (2013) avaliou *in vitro* uma medicação intracanal com EGCG associado ao PEG 400 em dentes decíduos e permanentes e notou que EGCG não mudou suas propriedades físico-químicas, sua estabilidade, além de não alterar a coloração do dente até 56 dias após sua aplicação nos canais desses dentes.

A otimização do tratamento endodôntico em dentes decíduos combinando a instrumentação com o uso de limas mecanizadas e medicações intracanaís com melhor efeito antimicrobiano é de extrema relevância em Odontopediatria, pois poderia diminuir o tempo clínico e melhorar os resultados clínicos do procedimento. Inúmeros sistemas de limas endodônticas mecanizadas estão disponíveis no mercado, porém, a maioria deles foram desenvolvidos para a instrumentação de dentes permanentes. Assim, estudos *in vitro* ainda são necessários para determinar o efeito desses sistemas no desgaste de dentina nos terços radiculares dos dentes decíduos a fim de aumentar a segurança na sua indicação clínica. Paralelamente, a literatura ainda é bastante divergente sobre qual medicação intracanal seria ideal para dentes decíduos que pudesse ter o efeito antimicrobiano desejado, sem afetar o dente permanente subjacente, auxiliando na manutenção dos dentes decíduos no arco até a época mais próxima possível da sua esfoliação fisiológica. Dessa forma, os objetivos da presente tese serão: 1) comparar dois protocolos de instrumentação endodôntica: um sistema rotatório e um sistema recíprocante, realizados em protótipos de molares decíduos por meio de microtomografia computadorizada (micro-CT); e 2) avaliar o efeito de duas propostas de medicações intracanaís: uma combinação triantibiótica (TRI) de metronidazol, ciprofloxacina e fosfomicina (FOSFO) e a associação de EGCG com FOSFO, em comparação com pasta de hidróxido de cálcio (CH) ou clorexidina (CHX), todos dissolvidos em polietilenoglicol 400 (PEG) em biofilmes multiespécies, a toxicidade em fibroblastos e atividades colagenolíticas e gelatinolíticas detectadas na dentina radicular.

Conclusão Geral

Conclui-se que ambos os protocolos de instrumentação endodôntica foram seguros para serem utilizados na pulpectomia em dentes decíduos, pois promoveram mínima diminuição do volume dentinário, transporte e centralização do canal, minimizando a redução da espessura dentinária e fraturas. Embora o tempo de instrumentação tenha sido menor para as limas reciprocantes, houve maior aumento no volume do canal em comparação às limas rotatórias. Em relação às medicações, EGCG+FOSFO contidos no PEG-400 apresentou propriedades antibiofilme e antiproteolítica, além de baixa citotoxicidade em concentrações mais baixas, podendo ser uma alternativa de medicação intracanal para fins endodônticos.

REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL

1. AAPD. American Academy of Pediatric Dentistry. Pulp Therapy for Primary and Immature Permanent Teeth. Recommendations: Best Practice - Reference Manual 2014; v.39 (6): 325-333.
2. Byström, A., Happonen, R.P., Sjögren, U., Sundqvist, G. Healing of periapical lesions of pulpless teeth after endodontic treatment with controlled assepsis. *Endod Dent Traumatol.* 1987; 3: 58-63.
3. Byström A., Claesson R., Sundqvist G. The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. *Endod Dent Traumatol.* 1985; 1: 170-5.
4. Chávez De Paz LE, Dahlén G, Molander A, Möller A, Bergenholtz G. Bacteria recovered from teeth with apical periodontitis after antimicrobial endodontic treatment. *Int Endod J.* 2003 Jul; 36(7):500-8.
5. Duque C, Caldo-Teixeira AS, Ribeiro AA, Ammari MM, Abreu FVA, Antunes LAA. Livro - Odontopediatria - Uma Visão Contemporânea. Ed.Santos 2013; 1: 698.
6. Duque C, Souza ACA, Aida KL, Pereira JA, Caiaffa KS, Santos VRD, et al. Synergistic antimicrobial potential of EGCG and fosfomycin against biofilms associated with endodontic infections. *J Appl Oral Sci.* 2023; 31: e20220282. doi: 10.1590/1678-7757-2022-0282.
7. Ferreira DCA. Desenvolvimento e caracterização físico-química de um sistema para liberação intracanal de Epigallocatequina-3-galato e seu efeito na cor dos dentes [dissertação]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto. 2013 [citado 2020-04-22]. doi:10.11606/D.58.2013.tde-26072013-094705.
8. Gotze Gda R, Cunha CB, Primo LS, Maia LC. Effect of the sodium hypochlorite and citric acid association on smear layer removal of primary molars. *Braz Oral Res* 2005; 19:261-6.
9. Hoshino E, Kurihara-Ando N, Sato I. In-vitro antibacterial susceptibility of bacteria taken from infected root dentine to a mixture of ciprofloxacin, metronidazole and minocycline. *Int Endod J.* 1996; 29: 125-130.
10. Hu ZQ, Zhao WH, Hara Y, Shimamura T. Epigallocatechin gallate synergy with ampicillin/sulbactam against 28 clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2001; 48, 361–364.
11. Iglesias-Linares A, Yáñez-Vico RM, Sánchez-Borrego E, Moreno-Fernández AM, Solano-Reina E, Mendoza-Mendoza A Stem cells in current paediatric dentistry practice. *Arch Oral Biol* 2013; 58, 227-238.

12. Jeon J, Kim JH, Lee CK, et al. The Antimicrobial Activity of (-)-Epigallocatechin-3-Gallate and Green Tea Extracts against *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* Isolated from Skin Wounds. *Ann Dermatol* 2014 Oct; 26(5): 564–569.
13. Katge F, Chimata VK, Poojari M, Shetty S, Rusawat B. Comparison of cleaning efficacy and instrumentation time between rotary and manual instrumentation techniques in primary teeth: an *in vitro* study. *International Journal of Clinical Pediatric Dentistry* 2016; v.9 (2): 124-127.
14. Kaya E, Elbay M, Yiğit D. Evaluation of the SelfAdjusting File system (SAF) for the instrumentation of primary molar root canals: a micro-computed tomographic study. *European Journal of Paediatric Dentistry* 2017; 18 (2):105-110.
15. Kim JH, Kim Y, Shin SJ, Park JW, Jung Y. Tooth Discoloration of Immature Permanent Incisor Associated with Triple Antibiotic Therapy: A Case Report. *Journal Endodontic* 2010; 36: 1086–1091.
16. Kummer TR, Calvo MC, Cordeiro MM, Sousa RV, Carvalho MJR. Ex vivo study of manual and rotary instrumentation techniques in human primary teeth. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics* 2008; v.10 (4): e84-92.
17. Lee P, Tan KS. Effects of Epigallocatechin gallate against *Enterococcus faecalis* biofilm and virulence. *Arch Oral Biol* 2015; 60: 393-399.
18. Machado JC. Efeito da combinação de antibióticos e sinvastatina sobre microrganismos de interesse endodôntico e na expressão de marcadores odontoblásticos. 68 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp) Faculdade de Odontologia. 2016. (14/00589-7).
19. Moghaddam KN, Mehran M, Zadeh HF. Root canal cleaning efficacy of rotary and hand files instrumentation in primary molars. *Iranian Endodontic Journal* 2009; 4 (2): 53-57.
20. Moraes RDR, Santos TMPD, Marceliano AMF, Pintor AVB, Lopes RT, Primo LG, Neves AA. Reciprocating instrumentation in a maxillary primary central incisor: A protocol tested in a 3D printed prototype. *International Journal of Paediatric Dentistry* 2019; 29 (1): 50-57.
21. Moreno-Hidalgo MC, Caleza-Jimenez C, Mendoza-Mendoza A, Iglesias Linares A (2014) Revascularization of immature permanent teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* 2014; 47, 321-331.
22. Nascimento JMQ, Prestes GBR, Silva MB. Full dent. sci; jul.-set. 2014, 5(20): 658-665.
23. Ozcan G, Sekerci AE, Cantekin K, Aydinbelge M, Dogan S. Evaluation of root canal morphology of human primary molars by using CBCT and comprehensive review of the literature. *Acta Odontol Scand.* 2016;74(4):250-8. doi: 10.3109/00016357.2015.1104721.

24. Prabhakar AR, Yavagal C, Dixit K, Naik SV. Reciprocating vs Rotary Instrumentation in Pediatric Endodontics: Cone Beam Computed Tomographic Analysis of Deciduous Root Canals using Two Single-File Systems. *Int J Clin Pediatr Dent* 2016; 9(1):45-49.
25. Ranly DM, Garcia-Godoy F. Current and potential pulp therapies for primary and young permanent teeth. *J Dent*. 2000; 28:153–61.
26. Reygaert WC. Green Tea Catechins: Their Use in Treating and Preventing Infectious Diseases. *Biomed Res Int*. 2018; 9105261. Published 2018 Jul 17. doi:10.1155/2018/9105261.
27. Salama FS, Abdelmegid FY. Six percent citric acid better than hydrogen peroxide in removing smear layer: An *in vitro* pilot study. *Pediatr Dent* 1994;16:424-6.
28. Sato T, Hoshino E, Uematsu H, Noda T. *In vitro* antimicrobial susceptibility to combinations of drugs on bacteria from carious and endodontic lesions of human deciduous teeth. *Oral Microbiol. Immunol.* jun. 1993; v.8 (3): 172-176.
29. Siqueira JF Jr, Rôças IN. Diversity of endodontic microbiota revisited. *J Dent Res*. 2009 Nov; 88 (11): 969-81.
30. Sjögren U., Figdor D., Spangberg L., Sundqvist G. The antimicrobial effect of calcium hydroxide as a short-term intracanal dressing. *Int Endod J*. 1991; 24: 119-25.
31. Smaïl-Faugeron V, Glenney AM, Courson F, Durieux P, Muller-Bolla M, Fron Chabouis H. Pulp treatment for extensive decay in primary teeth. *Cochrane Database of Systematic Review* 2018; v.5, CD003220.
32. Souza BK, Alcalde MP, Duarte MAH, Machado MAAM, Oliveira TM, Lourenço Neto N. Shaping ability of a pediatric motor-driven instrumentation system in primary molar root canal prototypes. *Braz Dent J*. 2023; 34(5): 36-42. doi: 10.1590/0103-6440202305372.
33. Steinmann J, Buer J, Pietschmann T, Steinmann E. Anti-infective properties of epigallocatechin-3-gallate (EGCG), a component of green tea. *Br J Pharmacol* 2013; 168: 1059 –73.
34. Tannure PN, Azevedo CP, Barcelos R, Gleiser R, Primo LG. Long-term outcomes of primary tooth pulpectomy with and without smear layer removal: a randomized split-mouth clinical trial. *Pediatr Dent*. 2011 Jul-Aug; 33(4):316-20.
35. Trope M. Treatment of the immature tooth with a non-vital pulp and apical periodontitis. *Dental Clinics of North America* 2010; 54: 313-324.
36. Vijayaraghavan R, Mathian VM, Sundaram AM, Karunakaran R, Vinodh S. Triple antibiotic paste in root canal therapy. *J. Pharm. Bioallied. Sci.* aug. 2012; v.4 (2): 230-233.

37. Xu X, Zhou XD, Wu CD. Tea catechin epigallocatechin gallate Inhibits *Streptococcus mutans* biofilm formation by suppressing gtf genes. Arch Oral Biol. 2012; 57: 678-83. DOI: 10.1016/j.archoralbio.2011.10.021.
38. Zhao WH, Hu ZQ, Okubo S, Hara Y, Shimamura T. Mechanism of synergy between epigallocatechin gallate and b-lactams against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2001; 45: 1737–1742.