

RESSALVA

Atendendo solicitação do (a) autor
(a), o texto completo desta tese será
disponibilizado a partir de

04/12/2021



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

ESTEBAN ISAI FLORES OROZCO

**REDUÇÃO DE BACTÉRIAS CULTIVÁVEIS,
LIPOPOLISSACARÍDEOS E COLAGENASE/MMP-8 NO
TRATAMENTO ENDODÔNTICO ASSOCIADO À ATIVAÇÃO
ULTRASSÔNICA NA INFECÇÃO ENDODÔNTICA PRIMÁRIA:
estudo clínico randomizado**

2019

ESTEBAN ISAI FLORES OROZCO

**REDUÇÃO DE BACTÉRIAS CULTIVÁVEIS,
LIPOPOLISSACARÍDEOS E COLAGENASE/MMP-8 NO
TRATAMENTO ENDODÔNTICO ASSOCIADO À ATIVAÇÃO
ULTRASSÔNICA NA INFECÇÃO ENDODÔNTICA PRIMÁRIA:
estudo clínico randomizado**

Tese apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR, pelo Programa de Pós-Graduação em ODONTOLOGIA RESTAURADORA.

Área de Endodontia. Linha de pesquisa: Ativação Ultrassônica na Endodontia.

Orientadora: Profa. Tit. Marcia Carneiro Valera

São José dos Campos

2019

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2020]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Flores Orozco, Esteban Isai

Redução de bactérias cultiváveis, lipopolissacarídeos e colagenase/mmp-8 no tratamento endodôntico associado à ativação ultrassônica na infecção endodôntica primária: estudo clínico randomizado / Esteban Isai Flores Orozco. - São José dos Campos : [s.n.], 2019.
67 f.

Tese (Doutorado em Odontologia Restauradora) - Pós-Graduação em Odontologia Restauradora - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2019.
Orientador: Marcia Carneiro Valera.

1. Endotoxinas. 2. Infecção endodôntica. 3. Irrigação ultrassônica. 4. Lesão periapical. 5. MMP-8. I. Carneiro Valera, Marcia, orient. II. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. IV. Universidade Estadual Paulista (Unesp). V. Título.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Titular Márcia Carneiro Valera (Orientador)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Profa. Dra. Flávia Goulart da Rosa Cardoso

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof. Associado Eduardo Bresciani

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof. Associado José Flávio Affonso de Almeida

Universidade Estadual de Campinas(Unicamp)

Faculdade de Odontologia de Piracicaba

Prof. Adjunto Daniel Rodrigo Herrera Morante

Universidade Federal Fluminense

Faculdade de Odontologia

São José dos Campos, 04 de dezembro do 2019.

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus mestres,
e aos futuros endodontistas,
por fazerem da área,
minha grande paixão.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Titular **Marcia Carneiro Valera Garakis** por sempre ser paciente comigo, por me brindar a oportunidade de formar-me no profissional que eu sou hoje. Por sempre ser tão rígida comigo, eu agradeço toda a sabedoria que nesses anos próximos dela eu adquiri. Com certeza essa nossa história vai ser contada por muito tempo além.

Agradeço ao **Instituto de Ciência e Tecnologia – Universidade Estadual Paulista** na linda cidade São José dos Campos, seu **corpo docente, direção e administração** por me abrir as portas e me brindar um espaço de aprendizagem e produção científica. Estou orgulhoso do que a instituição representa e de ter me formado aqui.

Agradeço a minha Alma Mater a **Universidade Autônoma de Nayarit** em México por ter acreditado no meu projeto acadêmico, o país representa para mim um exemplo de luta diário, e a educação será sempre a melhor alternativa.

Agradeço ao corpo docente da área de Endodontia, o Professor **Claudio Antônio Talge Carvalho** e a Professora **Ana Paula Martins Gomes**, pelo apoio incondicional que me proporcionaram sempre, e lembrarei deles com aquela alegria que todos os dias os caracterizou.

Agradeço ao professor **Eduardo Bresciani** pela amizade criada, sendo ele para mim, um exemplo de vida, pela inteligência, alegria e convicção sobre o saber viver, impulsando sempre para frente os grandes projetos. Agradeço aos professores da área de Dentística Profa. **Taciana**, Profe. **Sergio** por ter compartilhado experiências e amizade, me sinto muito feliz por ter conhecido vocês.

Agradeço à Professora **Flavia Goulart da Rosa Cardoso**, pela ajuda que você me deu do começo ao fim da história na minha pós-graduação,

sempre a disposição e sem esperar nada em troca. Obrigado de coração, desejo tudo o melhor para você.

Agradeço ao Professor **José Flavio e Daniel Herrera**, fico muito feliz em serem partícipes da minha banca de defesa, agradeço pelos conhecimentos que indiretamente segui das suas carreiras, vocês representam a endodontia que faz a diferença.

Agradeço à secretaria da Pós-graduação, **Bruno Shiguemitsu**, pela grande ajuda e amizade que me proporcionaram durante todo o tempo na instituição.

Agradeço as técnicas do laboratório, **Josiana e Fernanda** e a secretaria **Liliane**, pela ajuda incondicional e pelas experiências vividas.

Agradeço ao professor **Renato Miotto Palo** por ter me mostrado o caminho para realizar meus sonhos. Por acreditar em mim sem me conhecer e me dar uma oportunidade pra continuar em frente.

Aos meus colegas e amigos da Endodontia **Diego, Alessandra, Felipe, Cristhian, Thais, Lais, Felipinho, Daniel, Ricardo** a todos vocês, obrigado. Agradeço a **Bruna Jordão** e a **Giovana Minhoto**, dras. colegas e amigas com um coração enorme, um futuro brilhante aguarda por vocês, devem saber que podem contar comigo sempre.

Agradeço a **Amjad Abu**, amigo/irmão que a Síria colocou no meu caminho, confesso que nunca conheci amizade mais fiel que a dele. Obrigado ao meu *roomie* **Guilherme Schmitt**, por me abrir as portas da tua casa, por todas aquelas conversas e histórias compartilhadas, pela amizade que vai longe. Obrigado **Eliseo Pablo Chun** pela grande amizade criada no Brasil, pelos conselhos e a parceria.

Agradeço à **Cassia Cestari, Rayana Khoury e Daiana Cavalli**, e aproveito para escrever que não existe texto que consiga expressar o grande carinho que tenho por vocês, elas representam para mim algo mais valorizado

que a amizade, porque eu cuidei delas e elas cuidaram mais ainda de mim, “igual a família faz”, elas viraram minhas irmãs.

Aos meus amigos/irmãos **Julio Ferraz, Andre Wood, Evandro Utrini, Pedro Albuquerque, Pedro Murillo, Rafo Ribeiro, Shun Maeda, Tiago Borges, Bastien, Breno, Matheus, Augusto e Paschoal** por todos nós juntos termos formado um lar, a República Saudosa Maloca.

Agradeço a minha **família**, meus pais e irmãos, por serem os pilares mais importantes da minha vida.

Agradeço a todos meus **amigos** da Pós-graduação e da Graduação por fazer parte desta história, com a mão no coração “muito obrigado”

Obrigado aos envolvidos nesta grande luta, por terem me apoiado no meu crescimento e formação, obrigado por me permitirem fazer parte da suas vidas e consequentemente, vocês parte da minha...

" A ciência, é feita de erros, mas de erros benéficos, já que conduzem pouco a pouco à verdade". Júlio Verne

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	9
RESUMO	10
ABSTRACT	12
1 INTRODUÇÃO	14
2 ARTIGO.....	18
2.1 Artigo - Flores Orozco EI, Toia CC, Corazza BJM, Khoury RD, Bresciani E, Palo RM, Valera MC. Redução de bactérias cultiváveis, lipopolissacarídeos e collagenase/mmp-8 no tratamento endodôntico associado à ativação ultrassônica na infecção endodôntica primária: estudo clínico randomizado/ Effectiveness of ultrasonically activated techniques on infectious/inflammatory contents in teeth with primary endodontic infection	18
3 CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	40
REFERÊNCIAS	44
APÊNDICE	51
ANEXOS.....	66

Flores Orozco EI. Redução de bactérias cultiváveis, lipopolissacarídeos e collagenase/mmp-8 no tratamento endodôntico associado à ativação ultrassônica na infecção endodôntica primária: estudo clínico randomizado [tese]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2019.

RESUMO

O objetivo desse estudo clínico randomizado foi avaliar em dentes com infecção endodôntica primária (IEP) os microrganismos anaeróbios cultiváveis (UFC/mL), níveis de endotoxinas (LPS) (EU/mL) e collagenase/MMP-8 da região periapical antes e durante o tratamento endodôntico utilizando diferentes protocolos de irrigação final: irrigação convencional (CNI), ativação ultrassônica passiva (PUA) e ativação ultrassônica contínua (CUA). Quarenta e cinco dentes com IEP foram submetidos ao tratamento endodôntico utilizando NaOCl 2.5% como solução irrigadora seguido do uso de EDTA 17%. Os protocolos de limpeza final foram realizados com irrigação com agulha convencional (controle), PUA e CUA; na sequência os canais foram preenchidos com pasta de Ca(OH)_2 + SS por 14 dias. Foram feitas coletas do conteúdo do canal radicular após abertura coronária (S1), após diferentes protocolos de irrigação final (S2) e após uso de medicação intracanal com pasta de hidróxido de cálcio [Ca(OH)_2] (S3). O conteúdo coletado do canal foi submetido às análises por cultura microbiológica (UFC/mL) e níveis de endotoxinas (EU/mL) pelo Lisado de Amebócitos de Limulus (LAL). Após preparo dos canais e após medicação com Ca(OH)_2 foram realizadas coletas do fluido periapical para análise da expressão de MMP-8 por ELISA. A análise estatística dos dados foi realizada pelos testes Kruskal-Wallis e Dunn para análise intergrupos de UFC/mL, LPS e MMP-8, todos eles com nível de significância de 5% ($P < 0.05$). Microrganismos anaeróbios cultiváveis foram detectados em 100 % das amostras iniciais (S1) com valor médio de 1.18×10^5 CFU/mL ($20 - 1.84 \times 10^6$ CFU/mL). CUA apresentou maior efetividade na redução de microrganismos anaeróbios cultiváveis em S3 (97.27%) seguido pela PUA (96.56%) e CNI (96.2%). Endotoxinas foram identificadas em 100% das amostras em S1 com valor médio de 538.10 EU/mL (0.017×6190 EU/mL), CUA mostrou uma maior redução nos níveis de LPS em S3 (97.75 %), seguido pela PUA (97.11%) e CNI (90.42%). O protocolo de irrigação final com ativação ultrassônica PUA e CUA favoreceu a redução de MMP-8 em comparação ao grupo CNI. Houve correlação estatística positiva entre os níveis de LPS e MMP-8. Conclui-se que o preparo biomecânico produz a maior redução no número de microrganismos anaeróbios e endotoxinas; O protocolo de irrigação final com PUA e CUA em associação ao preparo biomecânico produz maior redução nos níveis de Endotoxinas e MMP-8

em comparação com CNI. Existe correlação estatística positiva entre os níveis de LPS e MMP-8 presentes nas infecções endodônticas primárias, mostrando a associação do LPS com o processo de destruição tecidual.

Palavras-chave: Endotoxinas. Infecção endodôntica. Irrigação ultrassônica. Lesão periapical. Micro-organismos. MMP-8.

Flores Orozco EI. Cultivable bacteria, lipopolysaccharides and neutrophil collagenase/mmp-8 reduction on the endodontic treatment associated to ultrasonic activation in primary endodontic infection: a randomized clinical trial [doctorate thesis]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2019.

ABSTRACT

The aim of this randomized clinical trial was to evaluate in cultivated anaerobic microorganisms (CFU / mL), endotoxin levels (LPS) (EU / mL) and periapical collagenase / MMP-8 in teeth with primary endodontic infection (EPI) before and during Endodontic treatment using different final irrigation protocols: conventional irrigation (CNI), passive ultrasonic activation (PUA) and continuous ultrasonic activation (CUA). Forty-five teeth with IEP were submitted to endodontic treatment using 2.5% NaOCl as an irrigating solution followed by 17% EDTA. Final cleaning protocols were performed with conventional needle irrigation (control), PUA and CUA; The root canals were then filled with Ca (OH)₂ paste for 14 days. Root canal contents were collected after coronary opening (S1), after root canal preparation (S2) and after intracanal calcium hydroxide paste [Ca (OH)₂] (S3). Samples of the root canal content was performed to analysis by microbiological culture (CFU/mL) and endotoxin levels (EU / mL) by Limulus Amebocyte Lysate (LAL). After canal preparation and after Ca (OH)₂ medication, periapical fluid samples were collected for analysis of MMP-8 expression by ELISA. Statistical analysis of the data was performed by Kruskal-Wallis and Dunn tests for intergroup analysis of CFU / mL, LPS and MMP-8, all with a significance level of 5% (P <0.05). Cultivable anaerobic microorganisms were detected in 100% of the initial samples (S1) with a mean value of 1.18 x 10⁵ CFU / mL (20 - 1.84 x 10⁶ CFU / mL). CUA showed greater effectiveness in reducing anaerobic microorganisms cultivable in S3 (97.27%) followed by PUA (96.56%) and CNI (96.2%). Endotoxins were identified in 100% of samples in S1 with a mean value of 538.10 EU / mL (0.017 x 6190 EU / mL), CUA showed a greater reduction in LPS levels in S3 (97.75%), followed by PUA (97.11%). and CNI (90.42%). The final irrigation protocol with ultrasonic activation PUA and CUA favored the reduction of MMP-8 compared to the CNI group. There was a positive statistical correlation between LPS and MMP-8 levels. It is concluded that the biomechanical preparation produces the greater reduction in the number of anaerobic microorganisms and endotoxins; The final irrigation protocol with PUA and CUA in combination with biomechanical preparation produces greater reduction in Endotoxin and MMP-8 levels compared to CNI. There is a positive statistical correlation between the levels of

LPS and MMP-8 present in primary endodontic infections, showing the association of LPS with the tissue destruction process.

Keywords: Endotoxins. Endodontic infection. Periapical lesion. MMP-8. Ultrasonic irrigation.

1 INTRODUÇÃO

A anatomia interna do dente é formada por uma complexa rede de ramificações, presença de irregularidades e istmos, que permitem a proliferação e colonização de micro-organismos ao interior do sistema de canais radiculares (SCR)(Tennert et al., 2014). Estes micro-organismos e seus subprodutos são responsáveis pela etiologia do desenvolvimento de lesões periapicais, uma vez que interagem entre eles de forma sinérgica, ou interferindo e evadindo à resposta do hospedeiro (Takehashi et al., 1965).

As infecções endodônticas são polimicrobianas, contendo micro-organismos Gram-positivos e micro-organismos Gram-negativos predominantemente bactérias anaeróbias (Sundqvist, 1994). Estas bactérias, após sua morte, liberam lipopolisacarídeos (LPS) ou endotoxinas presentes na superfície da membrana externa da parede celular (Rietschel et al., 1996), sendo o LPS altamente citotóxico, atua sobre macrófagos, neutrófilos e fibroblastos levando à liberação de mediadores bioativos e citocinas pró-inflamatórias (Mohammadi, Dummer, 2011), mesmo estando presente em baixas concentrações consegue produzir uma resposta imune inata do hospedeiro desencadeando dano tecidual ou/e reabsorção óssea (Beutler, Poltorak, 2000; Cardoso et al., 2015; Martinho et al., 2012)

As metaloproteinases (MMPs) são enzimas responsáveis pela degradação da matriz extracelular, enzimas metalo-dependentes de zinco e Cálcio que atuam na modelagem, desenvolvimento e destruição de tecidos periapicais com a degradação de colágeno. As fibras de colágeno constituem a maior parte da matriz extracelular da região periapical e em condições patológicas são fragmentadas por MMPs collagenases (MMPs 1, 8 e 13) e degradadas por MMPs gelatinases (MMPs 2 e 9). Metaloproteinases tais como MMP-8 são importantes na patogênese periapical, uma vez que atuam na degradação da matriz orgânica

extracelular (Broverman et al., 1998) que é um dos primeiros estádios de reabsorção óssea periapical (Shin et al., 2002). Além disto, MMP-8 são ativadas por proteases bacterianas (Cazalis et al., 2009).

No tratamento endodôntico substâncias químicas são utilizadas durante o preparo biomecânico e medicação intracanal com finalidade de combater microrganismos e seus produtos e consequente diminuição do processo inflamatório periapical. Soluções como o hipoclorito de sódio (NaOCl), possui ação solvente de matéria orgânica e antimicrobiana (Cavalli et al., 2017; Kuruvilla and Kamath, 1998; Valera et al., 2014), sendo indicado como irrigante em diferentes concentrações durante o tratamento endodôntico. No entanto, o NaOCl não remove a camada de *smear layer* (Asna Ashari et al., 2009; Chang et al., 2001; Menezes et al., 2003; Valera et al., 2010), uma vez que não atua sobre a parte inorgânica desta camada. Para a melhor remoção desta camada utiliza-se agentes quelantes, sendo o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) a substância química mais utilizada, com eficiência comprovada na dissolução de *smear layer* (Carvalho et al., 2008; Haapasalo et al., 2010; Valera et al., 2010). No entanto, devido a complexa anatomia dos canais radiculares e presença dos túbulos dentinários que podem permanecer parcialmente obliterados pelos resíduos mesmo após o uso dos quelantes, novos métodos de irrigação vêm sendo utilizados (Gu et al., 2009; Gulabivala et al., 2010).

Na pratica endodôntica, utiliza-se o NaOCl seguido do EDTA pois o NaOCl atua na matéria orgânica enquanto que o EDTA remove o componente inorgânico da camada residual deixada nas paredes do canal durante o preparo biomecânico (Briseno et al., 1992; Craigbaumgartner, Mader, 1987). Sendo assim, a combinação destes irrigantes associados e a ativação por ultrassom pode resultar em maior limpeza dos canais radiculares e aumento das propriedades antimicrobianas dos irrigantes (Al-Jadaa et al., 2009), contribuindo para maior sucesso da terapia endodôntica.

A irrigação ultrassônica têm sido aplicada para melhorar a limpeza durante o tratamento endodôntico devido à complexa anatomia do sistema de canais radiculares como istmos nos terços cervical e médio do canal radicular.

A irrigação ativada com ultrassom potencializa as propriedades da solução irrigadora devido aos diferentes fenômenos que ocorrem durante sua aplicação como agitação, cavitação, microcorrente acústica e geração de calor irão produzir efeitos nas estruturas dentais, especialmente sobre a dentina e camada residual (Walmsley, 1987), que em combinação com soluções irrigadoras aumentam os efeitos antimicrobianos. De acordo com Briseno et al. (1992), a utilização do NaOCl associado ao ultrassom faz com que ocorra maior eliminação de resíduos da camada de *smear layer*, levando a melhor limpeza do sistema de canais radiculares.

O ultrassom pode ser utilizado de forma intermitente ou continua sobre o NaOCl durante o tratamento endodôntico. Pesquisas têm sido desenvolvidas utilizando a Ativação Ultrassônica Passiva (PUA) para a ativação da solução irrigadora após o preparo biomecânico do canal radicular (Gu et al., 2009; Plotino et al., 2007; van der Sluis et al., 2007), além do PUA, a ativação ultrassônica continua (CUA) produz um fluxo ao interior do canal radicular permitindo a substituição da solução ininterruptamente (Castelo-Baz et al., 2016; Jiang et al., 2012). Em ambos os casos o inserto ultrassônico permanece no canal radicular sem contato com as paredes, na premissa que a energia gerada pelo inserto ultrassônico potencialize as propriedades da solução irrigadora mediante cavitação (Kato et al., 2016; Vivan et al., 2016).

Entretanto, bactérias presentes no sistema de canais radiculares, e zonas de propagação microbiana podem permanecer após a instrumentação e irrigação, sendo necessário o uso de medicação intracanal para auxiliar na eliminação das bactérias e seus produtos, possibilitando assim atingir maior o sucesso clínico (Ferreira et al., 2015; Katebzadeh et al., 1999; Nelson-Filho et al., 2002). Entre as substâncias utilizadas, o hidróxido de cálcio (Ca (OH)_2) é a principal

medicação intracanal devido a suas propriedades antimicrobianas contra a maioria dos agentes patogênicos (Athanasiadis et al., 2007; Ferreira et al., 2015; Mohammadi, Dummer, 2011).

Assim, o presente trabalho foi delineado com objetivo de avaliar os níveis de microrganismos anaeróbios cultiváveis, níveis de endotoxinas e sua correlação com níveis de collagenase/MMP-8 da região periapical nas diferentes fases do tratamento endodôntico utilizando diferentes protocolos de irrigação final com NaOCl após preparo biomecânico. Espera-se com este estudo, verificar que a ativação do irrigante com ultrassom favorecera a limpeza e descontaminação no tratamento da infecção endodôntica primária.

3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

No presente ensaio clínico randomizado, níveis de microrganismos, LPS e sua correlação com collagenase MMP-8 foram avaliados após diferentes protocolos de irrigação final (CNI, PUA e CUA), com o intuito de melhorar a descontaminação na terapia endodôntica. Diferentes protocolos de desinfecção têm sido implementados na tentativa de eliminar os microrganismos e seus subprodutos presentes no interior do sistema de canais radiculares. A ativação do irrigante com ultrassom foi utilizada como coadjuvante na limpeza após instrumentação, potencializando a ação da substância química pela ação física promovida pela cavitação, transmissão acústica e aquecimento do irrigante. Estas propriedades do ultrassom, além de permitir maior penetração da solução irrigadora, favorece a limpeza e pode potencializar a ação dos irrigantes, melhorando a atividade antimicrobiana (Lee et al., 2004; Robinson et al., 2018; van der Sluis, 2015)

Nesse estudo foi utilizado hipoclorito de sódio 2.5% como solução irrigadora por ser considerado uma das soluções mais utilizadas, em associação ao preparo biomecânico do canal radicular devido sua propriedade antimicrobiana e capacidade de dissolver tecido pulpar (Guerisoli et al., 2002; Mohammadi, 2008). Para a irrigação do canal radicular foram utilizados 24 mL de NaOCl 2.5% durante o PBM, dividido por terços radiculares, melhorando a neutralização do conteúdo necrótico, metodologia semelhante utilizada em outros estudos (Cardoso et al., 2016; Cavalli et al., 2017).

Entretanto, NaOCl é incapaz de remover a camada de *smear layer* (Asna Ashari et al., 2009; Chang et al., 2001; Menezes et al., 2003; Valera et al., 2010), uma vez que não atua sobre a parte inorgânica da camada residual. Assim, para melhor remoção desta camada, torna-se necessário o uso de uma solução que tenha propriedades desmineralizantes (Hülsmann et al., 2003), sendo o ácido

etilenodiaminotetracético (EDTA) a substância química mais utilizada, com eficiência comprovada na dissolução de *smear layer* (Carvalho et al., 2008; Haapasalo et al., 2010; Valera et al., 2010). O EDTA reage com os íons de cálcio na dentina e forma quelatos de cálcio solúveis, sendo que o mesmo descalcifica a dentina a uma profundidade de 20-30 μm . (Anas Al-Jadaa et al., 2009). No presente estudo foi utilizado 1mL de EDTA, até que o canal fosse preenchido, deixando-o atuar somente na camada residual por 5 minutos, como preconizado em trabalhos anteriores (Cardoso et al., 2016).

Vários métodos têm sido pesquisados para a quantificação e identificação de bactérias, assim como, para a quantificação de endotoxinas. No presente estudo o conteúdo coletado do canal radicular foi armazenado em VMGA III (Ali et al., 1995), seguido da semeadura em placas de petri contendo meio de cultura FAA e BHI, auxiliando na detecção de microrganismos anaeróbios estritos ou facultativos e aeróbios, respectivamente.

O desenvolvimento das infecções endodônticas primárias origina-se pela proliferação de múltiplas comunidades bacterianas (Sundqvist, 1994). Na metodologia do presente estudo, coletas do conteúdo do canal radicular mostraram a presença de bactérias anaeróbias cultiváveis na coleta realizada após abertura coronária (S1) em todas as amostras. Verificou-se ainda uma redução no número de MO anaeróbios cultiváveis após PBM (S2) utilizando NaOCl 2.5% nos diferentes protocolos de irrigação. No entanto, o grupo PUA apresentou maior redução no número de bactérias cultiváveis (97.85%), em comparação aos grupos CNI (97.62%) e CUA (85.67%), consequentemente se estabelece uma diferença estatística de microrganismos cultiváveis comparando os diferentes grupos testados. Após a remoção da MIC (S3) os resultados mostraram uma redução na contagem de colônias bactérias nos grupos CUA, PUA e CNI de 97.27%, 96,56% e 96.2% respectivamente. Corroborando os resultados com estudos anteriores, a ação ultrassônica em combinação à ação do irrigante promove maior limpeza e remoção de *smear layer*. consequentemente atingindo

uma maior efetividade antimicrobiana (Bueno et al., 2019, Neelakantan et al., 2019; Souza et al., 2019). Os resultados mostram que o protocolo de irrigação com PUA promove uma maior redução no número de MO, após PBM quando comparado com CNI (S2) (Nagendrababu et al., 2018). Além disso, é relevante destacar a efetividade na descontaminação obtida pela ação da cavitação promovida pelo ultrassom associado a ação do NaOCl que foi renovado durante a irrigação (Bueno et al., 2019), mostrando melhores resultados de descontaminação em S3 quando comparados CUA com CNI.

Estudos anteriores mostram que fatores de virulência de bactérias gram-negativas como LPS estão associadas ao desenvolvimento de lesões periapicais (Cardoso et al., 2015; Jacinto et al., 2005) . Além disto, LPS pode gerar uma reação incontrolada direta e iminente sobre leucócitos especificamente neutrófilos ocasionando a ativação de MMPs. No presente estudo, os resultados analisados relacionados aos níveis de collagenase/MMP-8 presentes na região periapical mostram que ao utilizar o protocolo de irrigação associado com CUA houve uma redução porcentual de 36.65% (S2). Em S3 não verificou-se diferença entre PUA e CUA que foram diferentes à irrigação convencional.

É sabido que as bactérias Gram-negativas possuem na sua estrutura diversos fatores de virulência como endotoxinas, que desencadeiam uma reação inflamatória associada à sintomatologia e reabsorção óssea (Martinho et al., 2017). No presente estudo verificou-se grande quantidade de LPS em todas as amostras analisadas (S1). Os resultados mostram uma redução estatística significativa após os diferentes protocolos de irrigação final (S2), mas sem obter uma total eliminação, sendo que a CUA reduziu (93.4%) seguido de PUA (87.23%) e CNI (84.85%) (S2). Devido a estrutura lipídica do LPS, para que ocorra sua inativação é preciso maior tempo de ação da substância química auxiliar (Siqueira, Rôças, 2005). Após uso de $(Ca(OH)_2)$ por 14 dias como medicação intracanal, níveis de LPS reduziram na CUA, e PUA, havendo diferenças estatísticas entre CUA e CNI. A limpeza que acontece pela ação físico-

mecânica da irrigação junto a ativação ultrassônica, pode favorecer maior penetração do irrigante nos túbulos dentinários abertos na porção apical do dente (Pacheco-Yanes et al., 2019), melhorando assim a limpeza com consequente redução de MO e seus produtos.

Dos métodos de irrigação, o uso do ultrassom para ativação do irrigante de forma passiva (PUA) têm mostrado resultados favoráveis na limpeza e desinfecção na terapia endodôntica (Bueno et al., 2019; Pacheco-Yanes et al., 2019), produzindo cavitação e micro-corrente acústica ativando a solução e favorecendo a limpeza dos túbulos dentinários. A irrigação com CUA, têm sido sugerido como protocolo clínico a fim de melhorar a desinfecção após PBM (Jiang et al., 2012). Esta técnica vem somar as características de ação física cavitacional e transmissão de energia acústica com a dissolução do tecido orgânico e ação antimicrobiana do irrigante, permitindo uma substituição continua da substância dentro do canal radicular (Layton et al., 2015).

Até a finalização desse estudo, não há relato na literatura endodôntica sobre a correlação entre LPS e collagenase/MMP-8. Verificou-se uma correlação fraca entre LPS e MMP-8 uma vez que pequenos aumentos de LPS desencadeiam grandes aumentos de MMP-8 (Reynaud af Geijersstam et al., 2005; Shin et al., 2011).

O tratamento realizado nos diferentes grupos avaliados foi considerado como sucesso clínico, considerando ausência de fistula, dor ou mobilidade. Os achados nesse estudo clínico poderão somar uma alternativa à terapia clínica.

Os estudos (Patan-Zugaj et al., 2018; Qiu et al., 2014) demonstram que mesmo níveis baixos de LPS podem desencadear a liberação de altos níveis de collagenase/MMP-8, corroborando essa informação com o presente estudo. Assim verificou-se que o uso de hipoclorito de sódio como irrigante têm a capacidade de reduzir os níveis de microrganismos, endotoxinas (Carvalho et al., 2016) e collagenase MMP-8 durante o preparo biomecânico, sendo essa ação favorecida pela ativação ultrassônica, tanto passiva quanto continua.

REFERÊNCIAS*

- Al-Jadaa A, Paqué F, Attin T, Zehnder M. Necrotic pulp tissue dissolution by passive ultrasonic irrigation in simulated accessory canals: impact of canal location and angulation. *Int Endod J*. 2009;42(1):59–65. doi: 10.1111/j.1365-2591.2008.01497.x. PMID: 19125981.
- Al-Jadaa Anas, Paqué F, Attin T, Zehnder M. Acoustic hypochlorite activation in simulated curved canals. *J Endod*. 2009;35(10):1408–11. doi: 10.1016/j.joen.2009.07.007. PMID: 19801241.
- Ali RW, Bancescu G, Nielsen O, Skaug N. Viability of four putative periodontal pathogens and enteric rods in the anaerobic transport medium VMGA III. *Oral Microbiol Immunol*. 1995;10(6):365–71. doi: 10.1111/j.1399-302x.1995.tb00168.x. PMID: 8602345.
- Asna Ashari M, Fayaz F, Moezzi Ghadim N, Alim Marvasti L, Mehrabi Y. Evaluation of the antimicrobial effects of MTAD, NaOCl against selected endodontic pathogens. *Iran Endod J*. 2009;4(2):63–8. PMID: 23940488.
- Athanassiadis B, Abbott P V, Walsh LJ. The use of calcium hydroxide, antibiotics and biocides as antimicrobial medicaments in endodontics. *Aust Dent J*. 2007;52(1 Suppl):S64-82. PMID: 17546863.
- Beutler B, Poltorak A. The search for Lps: 1993-1998. *J Endotoxin Res*. 2000;6(4):269–93. PMID: 11521047.
- Briseno M. BM, Wirth R, Hamm G, Standhartfnger W. Efficacy of different irrigation methods and concentrations of root canal irrigation solutions on bacteria in the root canal. *Dent Traumatol*. 1992;8(1):6–11. doi: 10.1111/j.1600-9657.1992.tb00218.x. PMID: 1396362.
- Broverman RL, Nguyen KH, da Silveira A, Brinkley LL, Macauley SP, Zeng T, et al. Changes in the expression of extracellular matrix (ECM) and matrix metalloproteinases (MMP) of proliferating rat parotid acinar cells. *J Dent Res*. 1998;77(7):1504–14. doi: 10.1177/00220345980770070501. PMID: 9663435.
- Bueno CRE, Cury MTS, Vasques AMV, Sarmiento JL, Trizzi JQ, Jacinto RC, et al. Cleaning effectiveness of a nickel-titanium ultrasonic tip in ultrasonically activated irrigation: a SEM study. *Braz Oral Res*. 2019;33(0):e017. doi: 10.1590/1807-3107bor-2019.vol33.0017. PMID: 30892412.

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [cited 2019 Aug 20]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Cardoso FG da R, Chung A, Martinho FC, Camargo CHR, Carvalho CAT, Gomes BPF de A, et al. Investigation of Bacterial Contents From Persistent Endodontic Infection and Evaluation of Their Inflammatory Potential. *Braz Dent J*. 2016;27(4):412–8. doi: 10.1590/0103-6440201600520. PMID: 27652703.

Cardoso FGR, Ferreira NS, Martinho FC, Nascimento GG, Manhães LRC, Rocco MA, et al. Correlation between Volume of Apical Periodontitis Determined by Cone-beam Computed Tomography Analysis and Endotoxin Levels Found in Primary Root Canal Infection. *J Endod*. 2015a;41(7):1015–9. doi: 10.1016/j.joen.2015.02.005. PMID: 25935504.

Cardoso FGR, Ferreira NS, Martinho FC, Nascimento GG, Manhães LRC, Rocco MA, et al. Correlation between Volume of Apical Periodontitis Determined by Cone-beam Computed Tomography Analysis and Endotoxin Levels Found in Primary Root Canal Infection. *J Endod*. 2015b;41(7):1015–9. doi: 10.1016/j.joen.2015.02.005. PMID: 25935504.

Carvalho AS, Camargo CHR, Valera MC, Camargo SEA, Mancini MNG. Smear layer removal by auxiliary chemical substances in biomechanical preparation: a scanning electron microscope study. *J Endod*. 2008;34(11):1396–400. doi: 10.1016/j.joen.2008.08.012. PMID: 18928856.

Carvalho AS, Oliveira LD de, Cardoso FG da R, Oliveira FE de, Valera MC, Carvalho CAT. Limewater and Polymyxin B Associated with NaOCl for Endotoxin Detoxification in Root Canal with Necrotic Pulp. *Braz Dent J*. 2016;27(5):573–7. doi: 10.1590/0103-6440201600934. PMID: 27982236.

Castelo-Baz P, Varela-Patiño P, Cantatore G, Domínguez-Perez A, Ruíz-Piñón M, Miguéns-Vila R, et al. In vitro comparison of passive and continuous ultrasonic irrigation in curved root canals. *J Clin Exp Dent*. 2016;8(4):e437–41. doi: 10.4317/jced.53023. PMID: 27703613.

Cavalli D, Toia CC, Flores Orozco EI, Khoury RD, Cardoso FG da R, Alves MC, et al. Effectiveness in the Removal of Endotoxins and Microbiological Profile in Primary Endodontic Infections Using 3 Different Instrumentation Systems: A Randomized Clinical Study. *J Endod*. 2017a;43(8):1237–45. doi: 10.1016/j.joen.2017.03.032. PMID: 28606669.

Cazalis J, Tanabe S, Gagnon G, Sorsa T, Grenier D. Tetracyclines and chemically modified tetracycline-3 (CMT-3) modulate cytokine secretion by lipopolysaccharide-stimulated whole blood. *Inflammation*. 2009;32(2):130–7. doi: 10.1007/s10753-009-9111-9. PMID: 19238528.

Chang YC, Huang FM, Tai KW, Chou MY. The effect of sodium hypochlorite and chlorhexidine on cultured human periodontal ligament cells. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2001;92(4):446–50. doi: 10.1067/moe.2001.116812. PMID: 11598582.

Craigbaumgartner J, Mader C. A scanning electron microscopic evaluation of four root canal irrigation regimens. *J Endod.* 1987;13(4):147–57. doi: 10.1016/S0099-2399(87)80132-2.

Ferreira NS, Martinho FC, Cardoso FGR, Nascimento GG, Carvalho CAT, Valera MC. Microbiological profile resistant to different intracanal medications in primary endodontic infections. *J Endod.* 2015;41(6):824–30. doi: 10.1016/j.joen.2015.01.031. PMID: 25892513.

Gu L, Kim JR, Ling J, Choi KK, Pashley DH, Tay FR. Review of contemporary irrigant agitation techniques and devices. *J Endod.* 2009;35(6):791–804. doi: 10.1016/j.joen.2009.03.010. PMID: 19482174.

Guerisoli DMZ, Marchesan MA, Walmsley AD, Lumley PJ, Pecora JD. Evaluation of smear layer removal by EDTAC and sodium hypochlorite with ultrasonic agitation. *Int Endod J.* 2002;35(5):418–21. PMID: 12059911.

Gulabivala K, Ng Y-L, Gilbertson M, Eames I. The fluid mechanics of root canal irrigation. *Physiol Meas.* 2010;31(12):R49-84. doi: 10.1088/0967-3334/31/12/R01. PMID: 21071831.

Haapasalo M, Shen Y, Qian W, Gao Y. Irrigation in Endodontics. *Dent Clin North Am.* 2010;54(2):291–312. doi: 10.1016/j.cden.2009.12.001. PMID: 20433979.

Hülsmann M, Heckendorff M, Lennon A. Chelating agents in root canal treatment: mode of action and indications for their use. *Int Endod J.* 2003;36(12):810–30. doi: 10.1111/j.1365-2591.2003.00754.x. PMID: 14641420.

Jacinto RC, Gomes BPFA, Shah HN, Ferraz CC, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Quantification of endotoxins in necrotic root canals from symptomatic and asymptomatic teeth. *J Med Microbiol.* 2005;54(Pt 8):777–83. doi: 10.1099/jmm.0.45976-0. PMID: 16014432.

Jiang L-M, Lak B, Eijssvogels LM, Wesselink P, van der Sluis LWM. Comparison of the Cleaning Efficacy of Different Final Irrigation Techniques. *J Endod.* 2012;38(6):838–41. doi: 10.1016/j.joen.2012.03.002. PMID: 22595122.

Takehashi 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;20(3):340–9. doi: 10.1016/0030-4220(65)90166-0. PMID:

14342926.

Katebzadeh N, Hupp J, Trope M. Histological periapical repair after obturation of infected root canals in dogs. *J Endod.* 1999;25(5):364–8. doi: 10.1016/S0099-2399(06)81173-8. PMID: 10530263.

Kato AS, Cunha RS, da Silveira Bueno CE, Pelegri RA, Fontana CE, de Martin AS. Investigation of the Efficacy of Passive Ultrasonic Irrigation Versus Irrigation with Reciprocating Activation: An Environmental Scanning Electron Microscopic Study. *J Endod.* 2016;42(4):659–63. doi: 10.1016/j.joen.2016.01.016. PMID: 26906240.

Kuruvilla JR, Kamath MP. Antimicrobial activity of 2.5% sodium hypochlorite and 0.2% chlorhexidine gluconate separately and combined, as endodontic irrigants. *J Endod.* 1998;24(7):472–6. doi: 10.1016/S0099-2399(98)80049-6. PMID: 9693573.

Layton G, Wu W-I, Selvaganapathy PR, Friedman S, Kishen A. Fluid Dynamics and Biofilm Removal Generated by Syringe-delivered and 2 Ultrasonic-assisted Irrigation Methods: A Novel Experimental Approach. *J Endod.* 2015;41(6):884–9. doi: 10.1016/j.joen.2015.01.027. PMID: 25749254.

Lee S-J, Wu M-K, Wesselink PR. The effectiveness of syringe irrigation and ultrasonics to remove debris from simulated irregularities within prepared root canal walls. *Int Endod J.* 2004;37(10):672–8. doi: 10.1111/j.1365-2591.2004.00848.x. PMID: 15347291.

Martinho FC, Chiesa WMM, Leite FRM, Cirelli JA, Gomes BPFA. Correlation between clinical/radiographic features and inflammatory cytokine networks produced by macrophages stimulated with endodontic content. *J Endod.* 2012;38(6):740–5. doi: 10.1016/j.joen.2012.02.021. PMID: 22595105.

Martinho FC, Gomes BPFA. Quantification of endotoxins and cultivable bacteria in root canal infection before and after chemomechanical preparation with 2.5% sodium hypochlorite. *J Endod.* 2008;34(3):268–72. doi: 10.1016/j.joen.2007.11.015. PMID: 18291273.

Martinho FC, de Rabello DGD, Ferreira LL, Nascimento GG. Participation of endotoxin in root canal infections: A systematic review and meta-analysis. *Eur J Dent.* 2017;11(03):398–406. doi: 10.4103/ejd.ejd_84_17. PMID: 28932155.

Menezes ACSC de, Zanet CG, Valera MC. Smear layer removal capacity of disinfectant solutions used with and without EDTA for the irrigation of canals: a SEM study. *Pesqui Odontol Bras.* 2003;17(4):349–55. PMID: 15107918.

Mohammadi Z. Sodium hypochlorite in endodontics: an update review. *Int Dent J.* 2008;58(6):329–41. PMID: 19145794.

Mohammadi Z, Dummer PMH. Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology. *Int Endod J*. 2011;44(8):697–730. doi: 10.1111/j.1365-2591.2011.01886.x. PMID: 21535021.

Nagendrababu V, Jayaraman J, Suresh A, Kalyanasundaram S, Neelakantan P. Effectiveness of ultrasonically activated irrigation on root canal disinfection: a systematic review of in vitro studies. *Clin Oral Investig*. 2018;22(2):655–70. doi: 10.1007/s00784-018-2345-x. PMID: 29372445.

Neelakantan P, Ounsi HF, Devaraj S, Cheung GSP, Grandini S. Effectiveness of irrigation strategies on the removal of the smear layer from root canal dentin. *Odontology*. 2019;107(2):142–9. doi: 10.1007/s10266-018-0373-2. PMID: 29956060.

Nelson-Filho P, Leonardo MR, Silva LAB, Assed S. Radiographic evaluation of the effect of endotoxin (LPS) plus calcium hydroxide on apical and periapical tissues of dogs. *J Endod*. 2002;28(10):694–6. PMID: 12398166.

Pacheco-Yanes J, Provenzano JC, Marceliano-Alves MF, Gazzaneo I, Pérez AR, Gonçalves LS, et al. Distribution of sodium hypochlorite throughout the mesial root canal system of mandibular molars after adjunctive irrigant activation procedures: a micro-computed tomographic study. *Clin Oral Investig*. 2019. doi: 10.1007/s00784-019-02970-5. PMID: 31240405.

Patan-Zugaj B, Gauff FC, Egerbacher M, Licka TF. Endotoxin-induced changes of type VII collagen- cleaving matrix metalloproteinases in lamellar tissue of extracorporeally perfused equine limbs. *Am J Vet Res*. 2018;79(9):986–94. doi: 10.2460/ajvr.79.9.986. PMID: 30153058.

Plotino G, Pameijer C, Mariagrande N, SOMMA F. Ultrasonics in Endodontics: A Review of the Literature. *J Endod*. 2007;33(2):81–95. doi: 10.1016/j.joen.2006.10.008. PMID: 17258622.

Qiu Z, Chen J, Xu H, Van den Steen PE, Opdenakker G, Wang M, et al. Inhibition of neutrophil collagenase/MMP-8 and gelatinase B/MMP-9 and protection against endotoxin shock. *J Immunol Res*. 2014;2014:747426. doi: 10.1155/2014/747426. PMID: 25762310.

Reynaud af Geijersstam A, Sorsa T, Stackelberg S, Tervahartiala T, Haapasalo M. Effect of *E. faecalis* on the release of serine proteases elastase and cathepsin G, and collagenase-2 (MMP-8) by human polymorphonuclear leukocytes (PMNs). *Int Endod J*. 2005;38(9):667–77. doi: 10.1111/j.1365-2591.2005.01011.x. PMID: 16104981.

Rietschel ET, Brade H, Holst O, Brade L, Müller-Loennies S, Mamat U, et al.

Bacterial endotoxin: Chemical constitution, biological recognition, host response, and immunological detoxification. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1996;216:39–81. PMID: 8791735.

Robinson JP, Macedo RG, Verhaagen B, Versluis M, Cooper PR, van der Sluis LWM, et al. Cleaning lateral morphological features of the root canal: the role of streaming and cavitation. *Int Endod J*. 2018;51:e55–64. doi: 10.1111/iej.12804. PMID: 28654211.

Shin S-J, Lee W, Lee J-I, Baek S-H, Kum K-Y, Shon W-J, et al. Matrix metalloproteinase-8 and substance P levels in gingival crevicular fluid during endodontic treatment of painful, nonvital teeth. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology*. 2011;112(4):548–54. doi: 10.1016/j.tripleo.2011.04.026.

Shin S, Lee J, Baek S, Lim S. Tissue Levels of Matrix Metalloproteinases in Pulp and Periapical Lesions. *J Endod*. 2002;28(4):313–5. doi: 10.1097/00004770-200204000-00013. PMID: 12043871.

Siqueira JF, Rôças IN. Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 1--current molecular technologies for microbiological diagnosis. *J Endod*. 2005;31(6):411–23. PMID: 15917679.

van der Sluis LWM. Endodontologie in beweging: nieuwe concepten, materialen en technieken 3. De rol van activatie van wortelkanaalspoelmiddelen tijdens de wortelkanaalbehandeling. *Ned Tijdschr Tandheelkd*. 2015;122(10):533–8. doi: 10.5177/ntvt.2015.10.15181. PMID: 26465016.

van der Sluis LWM, Versluis M, Wu MK, Wesselink PR. Passive ultrasonic irrigation of the root canal: a review of the literature. *Int Endod J*. 2007;40(6):415–26. doi: 10.1111/j.1365-2591.2007.01243.x. PMID: 17442017.

Souza C, Bueno C, Kato A, Limoeiro A, Fontana C, Pelegri R. Efficacy of passive ultrasonic irrigation, continuous ultrasonic irrigation versus irrigation with reciprocating activation device in penetration into main and simulated lateral canals. *J Conserv Dent*. 2019;22(2):155. doi: 10.4103/JCD.JCD_387_18. PMID: 31142985.

Sundqvist G. Taxonomy, ecology, and pathogenicity of the root canal flora. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1994;78(4):522–30. doi: 10.1016/0030-4220(94)90047-7. PMID: 7800383.

Tennert C, Fuhrmann M, Wittmer A, Karygianni L, Altenburger MJ, Pelz K, et al. New bacterial composition in primary and persistent/secondary endodontic infections with respect to clinical and radiographic findings. *J Endod*. 2014;40(5):670–7. doi: 10.1016/j.joen.2013.10.005. PMID: 24767562.

Valera MC, Chung A, Menezes MM, Fernandes CEF, Carvalho CAT, Camargo SEA, et al. Scanning electron microscope evaluation of chlorhexidine gel and liquid associated with sodium hypochlorite cleaning on the root canal walls. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010;110(5):e82-7. doi: 10.1016/j.tripleo.2010.04.051. PMID: 20692188.

Valera MC, Maekawa LE, Chung A, Cardoso FGR, Oliveira LD de, Oliveira CL de, et al. The effect of sodium hypochlorite and ginger extract on microorganisms and endotoxins in endodontic treatment of infected root canals. *Gen Dent*. 2014;62(3):25–9. PMID: 24784510.

Vivan RR, Duque JA, Alcalde MP, Só MVR, Bramante CM, Duarte MAH. Evaluation of Different Passive Ultrasonic Irrigation Protocols on the Removal of Dentinal Debris from Artificial Grooves. *Braz Dent J*. 2016;27(5):568–72. doi: 10.1590/0103-6440201600725. PMID: 27982235.

Walmsley AD. Ultrasound and root canal treatment: the need for scientific evaluation. *Int Endod J*. 1987;20(3):105–11. doi: 10.1111/j.1365-2591.1987.tb00600.x. PMID: 3333651.