

FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
DOUTORADO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM CTBMF

HEDELSON ODENIR IECHER BORGES

**Uso de crioterapia em dentes
inoculados com *Enterococcus
faecalis*: um estudo *in vitro***

Porto Alegre
2007

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
DOUTORADO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM CTBMF

**Uso de crioterapia em dentes inoculados com
Enterococcus faecalis: um estudo *in vitro***

HEDELSON ODENIR IECHER BORGES

Tese apresentada como parte dos requisitos obrigatórios para a obtenção do
título de Doutor em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial

Diagnóstico e terapêutica aplicadas
Linha de pesquisa

Prof. Dr. Manoel Sant'Ana Filho
Orientador

Porto Alegre, dezembro de 2007.

*“Tudo o que pedirdes na oração,
crede que o tendes recebido
e se-vos-á dado”.*

Marcos 11.24

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos

A **DEUS**, pelo constante oferecimento de oportunidades em minha vida.

À minha família;

A meus pais, **José e Deli**, pelo amor e apoio incondicionais em todos os períodos da minha vida. Sua dedicação e esforço pelos filhos são exemplos a serem seguidos.

Aos meus irmãos, **Humberto e Heber**, pela amizade e cumplicidade cada vez mais crescentes.

Aos demais familiares pela compreensão nos momentos de ausência.

À minha namorada **Thalita**, por fazer parte de minha vida. Seu entendimento e apoio fazem aumentar, ainda mais, minha admiração por você.

Aos amigos Heberth “Bilo”, Emerson “Fonseca”, Marcos Dietz “Cabeleira”, Ricardo “Dot`s”, Roberto “Barata”, Eduardo “Dusage” Brunozi, Reginaldo “Toro”, Régis, Fábio, Carlo Augustus “Munguinho”, Marcos “Conan” e Pedro “Pret”. Sua amizade engrandece e propicia momentos de alegria e felicidade.

Aos amigos e colegas de profissão Glaykon Stabile e Rodrigo Veronesi, pelo companheirismo e amizade desde a época de graduação.

À Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, na pessoa do reitor Prof. Dr. **Joaquim Clotet**.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento Pessoal de Ensino Superior (CAPES), por viabilização de bolsa de estudo, possibilitando a confecção deste trabalho.

À Faculdade de Odontologia da PUCRS, na pessoa de seu Diretor, Prof. **Marcos Túlio Mazzini Carvalho**.

Ao Prof. Dr. **Manoel Sant'Ana Filho**, meu orientador e mestre. Agradeço os votos de confiança durante esta caminhada, os ensinamentos e exemplos de profissionalismo e caráter.

À Prof^a. Dr^a. **Nilza Pereira da Costa**, coordenadora do Curso de Pós-graduação em Odontologia da PUCRS, pela serenidade e apoio durante esta pós-graduação.

À Prof^a. Dr^a. **Daniela Nascimento Silva**, pela dedicação à docência e humildade com que lida com as pessoas, alunos ou pacientes, mostrando-se sempre acessível e de agradável convivência.

À Prof^a. Dr^a. **Maria Martha Campos**, pela ajuda e invejável disponibilidade em todos os momentos.

Ao Prof. Dr. **Pantelis Varvaki Rados**, pelo exame minucioso do trabalho durante a confecção de sua parte escrita.

Aos Professores Ms. **Luis Fernando Vieira Rodrigues** e Dr. **Ricardo Smidt**, pela ajuda durante a realização da parte experimental do trabalho.

Aos demais professores do Programa de Pós-graduação da PUCRS, Dr. **Cláiton Heitz**, Dr^a. **Elaine Bauer Veeck**, Dr. **Gilson Correia Beltrão**, Dr^a. **Helena Wilhelm de Oliveira**, Dr. **João Batista Blessmann Weber**, Dr^a. **Karen Cherubine**, Dr^a. **Liliane Soares Yurgel**, Dr^a. **Márcia Rejane Brucker**, Dr^a. **Marília Gerhardt de Oliveira**, Dr. **Rogério Belle de Oliveira**, Dr. **Rogério Miranda Pagnoncelli**, Dr^a. **Saete Maria Pretto**, por todos os ensinamentos compartilhados.

À Universidade Estadual de Londrina e professores do Curso de Odontologia, pela acolhida durante a realização da graduação em Odontologia.

Aos professores da disciplina de Cirurgia Bucal da Universidade Estadual de Londrina, **David Wilson Ahyub**, Ms. **Éden Brugnara**, Dr. **Sílvio de Oliveira Rodrigues** e **Youko Higashi**, pela orientação no início da caminhada. Agradeço, em especial, ao Dr. **José Roberto Pinto** e à Ms. **Lígia Pozzobon Martins**. Vocês foram os responsáveis pelo despertar do interesse pela Cirurgia e indicaram o caminho a ser seguido dentro da especialidade. Minha gratidão pela cooperação e possibilidade de conviver e aprender com seus anos de experiência.

Ao **Prof. Dr. Washington Rodrigues Camargo**, pela confiança no início de minha carreira como professor universitário.

Aos meus amigos e colegas, André, Marconi, Roger, Rosilene e Vinícius, presentes durante parte ou toda pós-graduação, pela fidelidade e ajuda mútua durante esta caminhada.

Aos demais colegas de turma e do programa de Pós-graduação, Carlos Alberto Martins, Daiane Granzotto, Danilo Ibrahim, Lênilson Gaião, Paulo Kreisner e Taiane Coutinho, pelo companheirismo e troca de experiências nestes anos.

Aos funcionários da Faculdade de Odontologia da PUCRS, em especial à Luísa, Carla e Glaci, pela atenção e paciência durante todo o decorrer do curso.

Aos funcionários da Secretaria de Pós-graduação em Odontologia da PUCRS, Ana Prestes, Davenir Brush, Marcos Correia e Carlos Minossi, pela atenção e ajuda sempre que necessário.

Aos pacientes e todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para que este trabalho fosse concluído.

RESUMO

Resumo

A crioterapia é uma técnica em que são utilizadas baixas temperaturas para promover necrose tecidual com finalidades terapêuticas, sendo a temperatura de -20°C considerada letal para as células. Em Odontologia seu uso é descrito no tratamento de diversas lesões, tanto em tecidos moles quanto ósseos. Não existem, porém, relatos clínicos da aplicação do congelamento em tecidos dentários. Outro aspecto é a ocorrência de situações clínicas, de infecções periapicais recorrentes, onde o tratamento endodôntico muitas vezes não é bem sucedido, sendo o paciente submetido a tratamento cirúrgico para resolução do problema. Assim, os objetivos deste trabalho foram verificar as temperaturas atingidas com o uso do *spray* de nitrogênio líquido em dentes humanos extraídos e também investigar se esta terapia, via canal dentário, tem efeito letal para colônias de bactérias *Enterococcus faecalis*, cultivadas em laboratório e inoculadas em dentes humanos extraídos. Na primeira parte do estudo, seis dentes humanos foram submetidos a dois ciclos de congelamento de 15 segundos cada, com um intervalo de descongelamento espontâneo de 4 minutos. A aplicação foi realizada em duas regiões: 1 mm aquém do ápice dentário e também na entrada do canal radicular. Com a aplicação a 1mm do ápice, foi obtida uma média aritmética de $-36,83^{\circ}\text{C}$ e de $-38,50^{\circ}\text{C}$ no ápice dentário, após primeiro e segundo ciclos, respectivamente. Com o posicionamento na entrada do canal, as médias obtidas foram $-2,66^{\circ}\text{C}$ e $-4,41^{\circ}\text{C}$ no ápice dentário, após primeiro e segundo ciclos, respectivamente. Com base nestes resultados é possível concluir que a crioterapia apresenta capacidade de atingir temperaturas consideradas letais em tecidos dentários. Na segunda parte da pesquisa, o nitrogênio líquido foi aplicado em 11 dentes humanos contaminados com *E. faecalis*. Foram realizados 3 ciclos de 60 segundos, com descongelamento de 4 minutos entre cada um. A média aritmética das porcentagens de redução do número de Unidades Formadoras de Colônias de *E. faecalis*, foi de $92,00 \pm 3,117$ (média \pm erro padrão da média). Conclui-se deste trabalho que a crioterapia foi efetiva na redução do número de bactérias intracanal, podendo apresentar uma eficácia na descontaminação do canal radicular.

Palavras chave¹: Crioterapia; *Enterococcus faecalis*; Dente; Microbiologia.

¹Bireme :- Centro Latino-Americano e do Caribe de Informações em Ciências da Saúde. DECS: Descritores em Ciência da Saúde. São Paulo. Bireme/OPAS, 2007. Disponível em <http://decs.bvs.br> . Acesso em 22 de outubro de 2007.

ABSTRACT

Abstract

Cryotherapy is the use of extremely low temperatures for tissue local destruction. Biological tissues subjected to a temperature of -20°C undergo cryogenic necrosis. It's been successfully used as a therapeutic method in various types of oral lesions. However, there are no clinical reports about cryotherapy application in tooth. Another point is the occurrence of recurrent periapical infections, where surgical procedures are commonly needed for resolution. Thus, the aims of this research were to evaluate the effect of cryotherapy with liquid nitrogen *spray* on human teeth and to verify, *in vitro*, the effect of liquid nitrogen *spray* on bacteria inoculated in extracted teeth. Firstly, cryotherapy was applied in six teeth. Two 15-second applications were accomplished, and thawing was allowed to proceed within 4 minutes. The applications were performed 1mm before the apical limit and at the canal root. In the first case, the mean temperatures were $-36,83^{\circ}\text{C}$ and $-38,50^{\circ}\text{C}$, after the first and the second freezing, respectively. In the second position, the mean temperatures were $-2,66^{\circ}\text{C}$ and $4,41^{\circ}\text{C}$, after first and second freezing, respectively. It's possible to suggest that cryosurgery is able to produce lethal temperatures on human teeth. In the second part of the research, cryotherapy with liquid nitrogen was applied in human teeth contaminated with *E. faecalis*. Three 60-second applications were accomplished, and thawing was allowed to proceed within 4 minutes. The mean percentages of reduction of bacterium colonies was $92,00 \pm 3,117$. we might conclude that cryotherapy was effective to decrease bacterium population.

Key words²: Cryotherapy; Enterococcus faecalis; Tooth, Microbiology.

²Bireme :- Centro Latino-Americano e do Caribe de Informações em Ciências da Saúde. DECS: Descritores em Ciência da Saúde. São Paulo. Bireme/OPAS, 2007. Disponível em <http://decs.bvs.br> . Acesso em 22 de outubro de 2007.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

UFC	Unidades formadoras de colônias
mm	milímetros
N₂	nitrogênio
°C	graus Celsius
nº	número
%	porcentagem
cm	centímetros
CPU	Central Processing Unit (Unidade central de processamento)
®	marca registrada
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ATCC	American Type Culture Collection (Coleção de culturas do tipo americana)
EPM	Erro Padrão da Média

LISTA DE GRÁFICOS E FIGURAS

Lista de gráficos e figuras

Artigo 1

EFEITO DA CRIOTERAPIA EM DENTES HUMANOS: UM ESTUDO *IN VITRO*

- Figura 1.** Termopares fixados nas regiões do ápice, 1/3 médio e 1/3 cervical.....**30**
- Figura 2.** Caixa termoplástica, demonstrando o controlador de temperatura (à direita) e a plataforma para fixação do dente (ao centro).....**30**
- Figura 3.** Criostato CRY-AC® - 3.....**31**
- Gráfico 1:** A) médias das temperaturas mínimas atingidas, em graus Celsius, com *spray* posicionado a 1mm do ápice após primeiro e segundo ciclos de congelamento; B) médias das temperaturas mínimas atingidas com *spray* posicionado na entrada do canal radicular, em graus Celsius, após primeiro e segundo ciclos de congelamento.
.....**34**

Artigo 2

USO DE CRIOTERAPIA COM NITROGÊNIO LÍQUIDO EM DENTES HUMANOS EXTRAÍDOS CONTAMINADOS POR *E. FAECALIS*

- Figura 1:** Representação do procedimento de contagem do número de UFC, para a estimativa do número de colônias de *E. faecalis* na superfície do meio ágar-sangue.....**43**
- Figuras 2A:** Contagem de UFC do dente 1, pré-congelamento.....**45**
- Figuras 2B:** Contagem de UFC do dente 1, pós-congelamento, evidenciando a redução do número de colônias bacterianas.....**45**
- Gráfico 1:** Médias das contagens de UFC pré e pós congelamento, evidenciando a redução do número de colônias bacterianas.....**46**

LISTA DE TABELAS

Lista de tabelas

Artigo 1

EFEITO DA CRIOTERAPIA EM DENTES HUMANOS: UM ESTUDO IN VITRO

- Tabela 1:** Médias das temperaturas mínimas atingidas, em graus Celsius, após 15 segundos de congelamento, com *spray* posicionado a 1 mm do ápice.....**33**
- Tabela 2:** Médias das temperaturas mínimas atingidas, em graus Celsius, após 15 segundos de congelamento, com *spray* posicionado na entrada do canal.....**34**
- Tabela 3:** Médias das temperaturas máximas atingidas, em graus Celsius, após 4 minutos de descongelamento espontâneo (entre os ciclos de congelamento com *spray* posicionado a 1 mm do ápice)**35**
- Tabela 4:** Médias das temperaturas máximas atingidas, em graus Celsius, após 4 minutos de descongelamento espontâneo (entre os ciclos de congelamento com *spray* posicionado na entrada do canal)**35**

Artigo 2

USO DE CRIOTERAPIA COM NITROGÊNIO LÍQUIDO EM DENTES HUMANOS EXTRAÍDOS CONTAMINADOS POR *E. FAECALIS*

- Tabela 1:** Número de UFC, antes e após a aplicação do nitrogênio líquido, e suas porcentagens de redução.....**46**
- Tabela 2:** Médias das temperaturas mínimas atingidas, em graus Celsius, após os ciclos de congelamento com nitrogênio líquido, com *spray* posicionado a 1 mm do ápice.....**48**

SUMÁRIO

Sumário

SUMÁRIO	19
1. INTRODUÇÃO	21
2. ARTIGOS	25
Avaliação da temperatura em dentes humanos após aplicação de crioterapia com nitrogênio líquido: um estudo in vitro.....	27
Resumo.....	27
Introdução	27
Material e método	29
Resultados	32
Discussão.....	35
Referências	37
Uso de crioterapia com nitrogênio líquido em dentes humanos extraídos contaminados por E. faecalis.....	40
Resumo.....	40
Introdução	40
Material e método	41
Resultados	44
Discussão.....	49
Referências	50
3. DISCUSSÃO	53
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	57
5. REFERÊNCIAS	59
ANEXOS	65
Termo de consentimento.....	66
Carta de aprovação da Comissão Científica e de Ética	67
Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa	68

1. INTRODUÇÃO

1. Introdução

A criocirurgia é um método efetivo de destruição tecidual por congelamento. Ela provoca uma destruição controlada, não-seletiva e tem sido utilizada no tratamento de diversas lesões bucais, tanto em tecidos moles como ósseos (EMMINGS, SHELDON e GAGE, 1967; WHITTAKER, 1975; GONGLOFF e GAGE, 1983; TAL e RIFKIN, 1986; TAL, 1992; SCHIMDT, POGREL, 2004).

Várias substâncias podem ser usadas como agentes criogênicos. O mais comum é o nitrogênio líquido que, em *spray* ou com o auxílio de uma sonda, tem sido aplicado isoladamente ou em associação a outros métodos cirúrgicos no tratamento de diversas patologias, tais como granuloma piogênico, angioma, queilite actínica, ceroacantoma, fibroma, leucoplasia e eritroplasia, líquen plano hipertrófico, hiperplasia papilar do palato e ceratocistos, entre outras (BEEK e BART, 1979; ISHIDA e RAMOS-e-SILVA, 1998; TURJANSKY e STOLAR, 1995; SCHIMDT e POGREL, 2004; BORGES 2005).

Os métodos de aplicação são classificados em abertos ou fechados. No primeiro, o criógeno é aplicado diretamente na lesão, por meio de *spray* ou hastes de algodão. Já no sistema fechado, não há contato direto entre o nitrogênio líquido e o tecido a ser destruído (LEOPARD, 1975; GONGLOFF et al., 1980; SANTOS, 2002; BELTRÃO, 2003).

Atualmente, o uso da crioterapia tem sido facilitado pelo aparecimento de aparelhos de fácil manuseio e versatilidade. Ferrer Bernat, em 1993, descreveu a utilização do CRY-AC® -3 da Brymill, um aparelho pequeno, de baixo custo, apresentando diversas pontas aplicadoras com angulações

variáveis. Desde então, diversos autores têm relatado seu uso em Odontologia (BIAZOLA e MORAES, 1995; LEMOS JÚNIOR, 1999; CERQUEIRA e SANT'ANA FILHO, 2001; SANTOS, 2002; BELTRÃO, 2003; SILVA, 2003; SCORTEGAGNA, 2004; BORGES, 2005).

Os efeitos deletérios do congelamento podem ser divididos em diretos e indiretos. Os diretos incluem desidratação e distúrbio eletrolítico da célula, alteração de pH, inibição enzimática, desnaturação de proteínas e ruptura da membrana celular. Os indiretos referem-se aos efeitos vasculares e imunológicos (LEOPARD, 1975; TAL, 1992; GONGLOFF e GAGE, 1983).

Os pacientes, frente ao tratamento com crioterapia, relatam um mínimo desconforto e podem ser tratados em nível ambulatorial, com ou sem sedação ou anestesia local. A ausência de dor está provavelmente relacionada à destruição das fibras nervosas. A cicatrização é livre de complicações como dor, hemorragia, infecção e dano inadvertido a estruturas adjacentes (EMMINGS, KOEPF e GAGE, 1967; HURT, NABERS e ROSE, 1972; POSWILLO, 1975; GONGLOFF e GAGE, 1983; TAL, 1992; BORGES, 2005).

Uma das desvantagens desta terapêutica, quando usada em tecidos moles, é o edema formado imediatamente após a aplicação. Isto predispõe ao risco de obstrução respiratória quando a crioterapia é realizada na base da língua, parede posterior da faringe e tonsilas (ISHIDA e RAMOS-e-SILVA, 1998).

Várias pesquisas realizadas no Programa de Pós-graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul comprovaram a eficácia da crioterapia em promover destruição tecidual em tecidos moles e ósseos, por meio de estudos em modelos animais e *in vivo*

(SANTOS, 2002; BELTRÃO, 2003; SILVA; 2003; SCORTEGAGNA, 2004; BORGES, 2005). Atualmente, os estudos têm procurado estabelecer a melhor forma de aplicação do agente crioterápico em tecido dentário. Em um destes trabalhos, Smidt (2006) desenvolveu um modelo experimental capaz de aferir a temperatura em diferentes regiões do dente, após aplicação do N₂ líquido na forma de *spray*.

Vários trabalhos em Odontologia têm mostrado que as infecções periapicais comumente apresentam *Enterococcus faecalis* como um dos principais microrganismos presentes. Estas bactérias apresentam a capacidade de resistir aos procedimentos químico-mecânicos endodônticos rotineiramente utilizados (HAAPASALO e ORSTAVIK, 1987; MOLANDER et al., 1998; SUNDQVIST et al., 1998; PECIULIENE et al., 2000). A fim de verificar o efeito da queda brusca e intensa da temperatura nestes microrganismos, Batista (2006) verificou o efeito da aplicação do *spray* de N₂ líquido em bactérias *Enterococcus faecalis* cultivadas em laboratório. Foi demonstrada diminuição com significância estatística no crescimento destas bactérias, sugerindo que a crioterapia pode apresentar eficácia na redução destas bactérias.

Desta forma, os objetivos desta pesquisa foram verificar o efeito da aplicação do *spray* de N₂ líquido em dentes humanos extraídos, após aplicação de ciclos sucessivos de congelamento e descongelamento espontâneo, além de verificar, *in vitro*, se a aplicação do *spray* de N₂ líquido, via canal dentário, tem efeito letal para as colônias de bactérias *Enterococcus faecalis*, cultivadas em laboratórios e inoculadas em dentes humanos extraídos.

2. ARTIGOS

2. Artigos

Artigo 1

Avaliação da temperatura em dentes humanos após aplicação de crioterapia com nitrogênio líquido: um estudo in vitro

Hedelson Odenir lecher BORGES

Ricardo SMIDT

Manoel SANT'ANA FILHO

Artigo em preparação para a revista European Journal of Oral Sciences.

Artigo 2

Uso de crioterapia com nitrogênio líquido em dentes humanos extraídos contaminados por E. faecalis

Hedelson Odenir lecher BORGES

Ricardo SMIDT

Luis Fernando Vieira RODRIGUES

Manoel SANT'ANA FILHO

Artigo em preparação para a revista International Endodontic Journal.

Artigo 1

Avaliação da temperatura em dentes humanos após aplicação de crioterapia com nitrogênio líquido: um estudo in vitro

Resumo

A crioterapia ou criocirurgia é uma técnica que consiste na aplicação de baixas temperaturas com finalidades terapêuticas. A temperatura necessária para que ocorra destruição tecidual é de aproximadamente -20°C . Em Odontologia, sua aplicação tem apresentado resultados favoráveis nos casos de lesões benignas em tecidos moles e ósseos, porém não existem relatos de seu uso clínico em tecidos dentários. Dessa maneira, o objetivo deste trabalho foi verificar as temperaturas atingidas com o uso do *spray* de nitrogênio líquido em dentes humanos extraídos, após aplicação de ciclos de congelamento. Seis dentes humanos uniradiculares foram submetidos a dois ciclos de congelamento de 15 segundos cada, com um intervalo de descongelamento espontâneo de 4 minutos. A aplicação foi realizada em duas regiões, em tempos distintos: 1 mm aquém do ápice dentário e também na entrada do canal radicular. Com a aplicação a 1 mm do ápice, foi obtida uma média aritmética de $-36,83^{\circ}\text{C}$ e de $-38,50^{\circ}\text{C}$ no ápice dentário, após primeiro e segundo ciclos, respectivamente. Com o posicionamento na entrada do canal, as médias obtidas foram $-2,66^{\circ}\text{C}$ e $-4,41^{\circ}\text{C}$ no ápice dentário, após primeiro e segundo ciclos, respectivamente. De acordo com os resultados do presente estudo, pode-se concluir que a crioterapia apresenta capacidade de atingir em tecidos dentários, temperaturas consideradas letais às células, podendo ter indicação para uma possível descontaminação do canal radicular.

Introdução

A crioterapia ou criocirurgia é uma técnica que consiste na aplicação de baixas temperaturas com finalidades terapêuticas. O criógeno mais empregado é o nitrogênio (N_2) líquido, que se apresenta inodoro, não tóxico ou inflamável e cuja temperatura potencial é de -196°C (TURJANSKY e STOLAR, 1995).

Os sistemas empregados para a criocirurgia podem ser classificados em abertos e fechados. No sistema fechado o congelamento do tecido é promovido pelo contato do tecido com uma sonda, através da qual o agente criogênico circula. Já no sistema aberto é aplicado diretamente na lesão, por *spray* ou haste de algodão (LEOPARD, 1975; READE, 1979; GONGLOFF et al., 1980; SANTOS, 2002; BELTRÃO, 2003).

Podem-se destacar algumas vantagens do uso da crioterapia, como: ausência de sangramento; mínimo desconforto para o paciente, mesmo sem

uso de anestesia local; baixas taxas de complicações; razoável predição do volume de destruição tecidual, facilidade de aplicação e possibilidade de repetição do tratamento, quantas vezes forem necessárias sem o aumento de cicatrizes (EMMINGS, KOEPF e GAGE, 1967; LEOPARD, 1975; GONGLOFF e GAGE, 1983; READE, 1979; FARAH e SAVAGE, 2006).

A temperatura necessária para alcançar destruição tecidual é de aproximadamente -20°C (FRASER e GILL, 1967; GETTER e PEREZ, 1972). A destruição tecidual alcançada é controlada, porém não-seletiva, e ocorre após ciclos de congelamento e descongelamento espontâneo. Com a queda da temperatura tecidual, ocorre a formação de cristais de gelo no meio extracelular, o que aumenta a concentração de eletrólitos. Isto cria um ambiente hiperosmótico e resulta na osmose de água para fora das células, gerando um aumento da concentração de eletrólitos intracelular, com alteração de pH e desnaturação de proteínas. Após o descongelamento, um novo resfriamento faz com que haja formação de cristais de gelo no meio intracelular. Com o derretimento do gelo, o meio extracelular torna-se ligeiramente mais hipotônico, ocorre entrada de água para as células, seu volume aumenta e ocorre a ruptura da membrana celular (EMMINGS, KOEPF e GAGE, 1967; LEOPARD, 1975; POSWILLO, 1978; GONGLOFF e GAGE, 1983; GAGE e BAUST, 1998; THAI e SINCLAIR, 1999).

Na Odontologia, principalmente em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial, a aplicação da crioterapia pode ser muito benéfica nos casos de lesões benignas em tecidos moles e ósseos, sendo relatado o seu uso em diversas lesões, tais como: granuloma piogênico, hemangioma, queilite actínica, ceroacantoma, fibroma, mucocele, leucoplasia e eritroplasia, líquen plano hipertrófico e hiperplasia papilar do palato e ceratocistos odontogênicos, além do tratamento de neuralgia trigeminal (BEEK e BART, 1979; TURJANSKY e STOLAR, 1992; TURJANSKY e STOLAR, 1995; ISHIDA e RAMOS-e-SILVA, 1998; YEH, 2000; PRADEL, et al., 2002; JAMES, WHEAR, 2004; SCHIMDT, POGREL, 2004; FARAH e SAVAGE, 2006). No entanto, pesquisas têm procurado estabelecer a melhor forma e aplicação do agente crioterápico no tecido dentário. Em um destes trabalhos, Smidt (2006) observou que a temperatura alcançada no ápice dentário, após aplicação do N_2 líquido em *spray*, atinge temperaturas consideradas letais às células.

Dessa forma, a aplicabilidade da crioterapia com nitrogênio líquido nos tecidos dentários, principalmente naquelas infecções periapicais recorrentes, advindas do insucesso do tratamento endodôntico, pode ser uma alternativa viável. Assim, o presente estudo teve como objetivo verificar as temperaturas atingidas com o uso do *spray* de nitrogênio líquido em dentes humanos extraídos, após aplicação de ciclos de congelamento.

Material e método

Foram utilizados seis dentes humanos uniradiculares extraídos devido indicação ortodôntica, sem interferência do cirurgião-dentista. Os pacientes permitiram a utilização dos elementos dentários por meio da assinatura de um termo de consentimento livre e esclarecido. O desenvolvimento do estudo foi realizado após aprovação do projeto (protocolo nº 94/06) pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

O acesso direto ao canal radicular foi obtido por meio de abertura coronária realizada com broca esférica diamantada nº 1011 em alta rotação com refrigeração contínua com soro fisiológico 0,9%. Em seguida, a modelagem do canal foi realizada com o auxílio de limas endodônticas¹, numa seqüência progressiva de diâmetro, até a lima nº 60, sendo o canal irrigado com soro fisiológico 0,9% durante a instrumentação. O preparo estendeu-se até 1 mm aquém do forame apical, sendo controlado por meio de tomadas radiográficas com radiografias periapicais.

A temperatura foi verificada por meio do modelo experimental desenvolvido por Smidt (2006). A fim de medir as variações de temperatura, foram utilizados termopares para o sistema de aquisição de dados. Os termopares foram fixados com resina fotopolimerizável² às superfícies radiculares, nas regiões do ápice, 1/3 médio e 1/3 cervical (Figura 1). A medição de temperatura através de termopares parte do princípio de que dois condutores metálicos diferentes, unidos em uma de suas extremidades e expostas a uma variação de temperatura, geram uma força eletromotriz expressa em *volts*, que pode ser mensurada na outra extremidade.

¹Limas endodônticas Maillefer (Suíça)

²Resina fotopolimerizável Filtek Z350 3M ESPE (St Paul, MN, EUA)

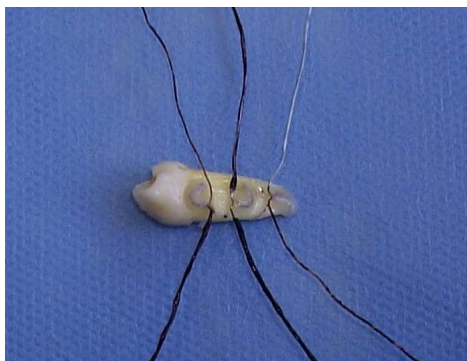


Figura 1. Termopares fixados nas regiões do ápice, 1/3 médio e 1/3 cervical.

Foi também utilizada uma caixa termoplástica de formato retangular, medindo 25 cm de comprimento, 20 cm de largura e 10 cm de altura. Em sua superfície foi posicionado um recipiente térmico cilíndrico construído em alumínio usinado, com 46 mm de diâmetro interno e 53 mm de profundidade (Figura 2). Na base deste recipiente, duas resistências elétricas tubulares embutidas foram instaladas com a finalidade de gerar calor em seu interior e manter a temperatura próxima à raiz dentária em 36°C, que corresponde à temperatura corporal média. O controle desta temperatura foi realizado por meio de equipamento digital.



Figura 2. Caixa termoplástica, demonstrando o controlador de temperatura (à direita) e a plataforma para fixação do dente (ao centro).

No interior do recipiente térmico, uma plataforma para fixação dentária permitiu a manutenção do dente na posição vertical. O recipiente foi preenchido

com silicone óleo, uma substância isolante, sendo que o dente permaneceu com a raiz mergulhada no silicone e sua coroa fora.

Os termopares foram ligados a uma placa de aquisição de dados por meio de cabos de extensão. Este último realizou a transmissão das diferenças de força eletromotriz. Os sinais foram transmitidos por um conversor RS485/32 a um conversor USB/232 até a CPU de um computador, onde os sinais em *volts* foram convertidos em unidades de medidas de temperatura, em graus Celsius, por um aplicativo (*software*) também desenvolvido por Smidt (2006).

Um criostato CRY-AC-3^{®3}(Cry-ac do Brasil, Osasco, São Paulo) (Figura 3) foi utilizado para aplicação do nitrogênio líquido no interior dos canais dentários. O citado aparelho apresenta-se na forma de um cilindro com capacidade de armazenamento de 0,5 litro de N₂ líquido. Em sua parte superior encontra-se uma válvula de alívio da pressão interna, para que não haja risco de explosão devido à ebulição do criógeno e um gatilho que libera o conteúdo sob pressão quando acionado. Também foram utilizadas agulhas descartáveis de 0,7 mm de diâmetro por 25 mm de comprimento com adaptador Luer Lock (#308).



Figura 3. Criostato CRY-AC[®] - 3.

A aplicação do nitrogênio líquido foi realizada em duas regiões: na primeira, o posicionamento da ponta da agulha foi intracanal, 1 mm aquém do

³CRY-AC[®]-3, fabricado pela empresa Brymill Cryogenics Systems e importado pela CRYAC[®] do Brasil.

ápice dentário. Foi aplicado o N₂ líquido durante 15 segundos, seguindo o protocolo definido por Smidt (2006), tempo este suficiente para atingir -20°C, temperatura letal às células. Depois, foi adotado um tempo de descongelamento espontâneo de 4 minutos. Em seguida, um novo ciclo de congelamento de 15 segundos foi realizado, para verificar a temperatura atingida no ápice dentário.

Finalizada esta parte experimental e após o descongelamento espontâneo dos elementos dentários, uma nova aplicação de nitrogênio líquido, seguindo o mesmo protocolo, foi realizada com a ponta da agulha localizada na entrada do canal radicular.

Em todas as etapas do experimento, as aplicações foram realizadas em duplicata, sendo usada a média das temperaturas atingidas, de cada um dos três pontos analisados, em cada dente, para maior confiabilidade dos resultados.

Os dados foram analisados de maneira descritiva e as médias aritméticas das temperaturas atingidas dispostas na forma de tabelas, para melhor visualização dos resultados obtidos.

Resultados

As temperaturas mínimas atingidas, após a primeira e a segunda aplicação do nitrogênio líquido, estão representadas nas Tabelas 1 e 2 e também no Gráfico 1, sendo a primeira Tabela para o *spray* posicionado a 1mm do ápice dentário e a segunda, para o *spray* posicionado na entrada do canal radicular. É possível verificar as diferenças de temperatura entre as porções do canal radicular após a aplicação da crioterapia. Como os experimentos foram realizados em duplicata, estão dispostas as médias das temperaturas mínimas atingidas.

Após o primeiro congelamento, a média aritmética das temperaturas mínimas atingidas, com a ponta do *spray* posicionada a 1 mm do ápice, foi de -36,83°C no ápice dentário, -24,34°C no 1/3 médio e de -12,75°C no 1/3 cervical (Tabela 1, Gráfico 1).

Tabela 1: Médias das temperaturas mínimas atingidas, com a ponta do *spray* posicionada 1 mm do ápice, após primeiro e segundo ciclos de congelamento.

TEMPERATURA MÍNIMA ATINGIDA (°C)						
	PRIMEIRO CONGELAMENTO			SEGUNDO CONGELAMENTO		
		<i>1/3 Médio</i>	<i>1/3</i>		<i>1/3 Médio</i>	<i>1/3</i>
	<i>Ápice</i>		<i>Cervical</i>	<i>Ápice</i>		<i>Cervical</i>
DENTE 1	-86,0	-22,5	-20,5	-90,5	-21,5	-12,0
DENTE 2	-27,0	-28,0	-06,5	-25,0	-32,5	-08,5
DENTE 3	-12,0	-24,5	-07,0	-13,5	-21,0	-04,0
DENTE 4	-10,5	-03,5	-10,0	-14,5	-14,0	-04,0
DENTE 5	-42,5	-32,0	-16,5	-43,0	-31,0	-16,5
DENTE 6	-43,0	-35,5	-16,0	-44,5	-38,5	-21,0
MÉDIAS (\pm EPM*)	-36,83\pm11,3	-24,33\pm4,5	-12,75\pm2,3	-38,50\pm11,7	-26,41\pm3,7	-11,00\pm2,8

* Erro Padrão da Média

Aguardado o tempo de descongelamento espontâneo de 4 minutos, a segunda aplicação de nitrogênio líquido foi realizada. Após este segundo congelamento, a média aritmética das temperaturas mínimas atingidas, com a ponta do *spray* posicionada a 1 mm do ápice, foi de -38,50°C no ápice dentário, -26,41°C no 1/3 médio e de -11,00°C no 1/3 cervical (Gráfico 1). Já com a ponta do *spray* posicionada na entrada do canal radicular, a média aritmética das temperaturas mínimas atingidas foi de -4,41°C no ápice dentário, -32,50°C no 1/3 médio e de -27,50°C no 1/3 cervical.

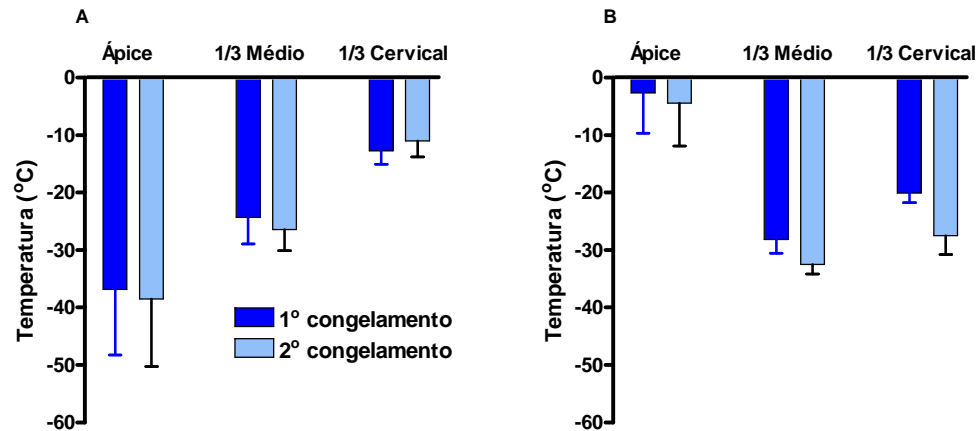


Gráfico 1: A) médias das temperaturas mínimas atingidas, em graus Celsius, com *spray* posicionado a 1 mm do ápice após primeiro e segundo ciclos de congelamento; B) médias das temperaturas mínimas atingidas com *spray* posicionado na entrada do canal radicular, em graus Celsius, após primeiro e segundo ciclos de congelamento .

Com o posicionamento da ponta do *spray* na entrada do canal radicular, a média aritmética das temperaturas mínimas atingidas, também após a primeira aplicação de nitrogênio líquido, foi de $-2,66^{\circ}\text{C}$ no ápice dentário, $-28,16^{\circ}\text{C}$ no 1/3 médio e de $-20,08^{\circ}\text{C}$ no 1/3 cervical (Tabela 2, Gráfico 1).

Tabela 2: Médias das temperaturas mínimas atingidas, após primeiro e segundo ciclos de congelamento, com a ponta do *spray* posicionada na entrada do canal radicular.

	TEMPERATURA MÍNIMA ATINGIDA (°C)					
	PRIMEIRO CONGELAMENTO			SEGUNDO CONGELAMENTO		
	Ápice	1/3 Médio	1/3 Cervical	Ápice	1/3 Médio	1/3 Cervical
DENTE 1	-36,0	-20,5	-18,0	-41,0	-26,0	-30,0
DENTE 2	12,5	-31,0	-16,0	04,5	-34,0	-18,5
DENTE 3	03,0	-29,0	-19,5	00,5	-32,0	-22,0
DENTE 4	06,0	-21,5	-18,0	08,0	-30,0	-41,5
DENTE 5	-04,5	-35,0	-21,5	04,0	-36,5	-28,0
DENTE 6	03,0	-32,0	-27,5	-02,5	-36,5	-25,0
MÉDIAS (\pm EPM*)	-02,66\pm7,0	-28,16\pm2,4	-20,08\pm1,6	-04,41\pm7,4	-32,50\pm1,6	-27,50\pm3,2

* Erro Padrão da Média

As temperaturas máximas atingidas, após o período de descongelamento espontâneo subseqüentes a primeira e a segunda aplicação do nitrogênio líquido, estão representadas nas Tabelas 3 e 4, sendo a primeira para o *spray* posicionado a 1 mm do ápice dentário e a segunda para o *spray* posicionado na entrada do canal radicular. Novamente estão dispostas as médias das temperaturas máximas atingidas, já que os experimentos foram realizados em duplicata.

Tabela 3: Médias das temperaturas máximas atingidas, em graus Celsius, após 4 minutos de descongelamento espontâneo (entre os ciclos de congelamento com *spray* posicionado a 1 mm do ápice).

TEMPERATURA MÁXIMA ATINGIDA (°C)			
	Ápice	1/3 Médio	1/3 Cervical
DENTE 1	28,7	27,5	31,5
DENTE 2	30,0	27,0	27,0
DENTE 3	30,0	28,0	28,0
DENTE 4	31,0	28,5	29,0
DENTE 5	29,0	26,0	26,0
DENTE 6	27,5	24,5	23,5
MÉDIAS (\pm EPM*)	29,36\pm0,5	26,91\pm0,5	27,50\pm0,1

* Erro Padrão da Média

Tabela 4: Médias das temperaturas máximas atingidas, em graus Celsius, após 4 minutos de descongelamento espontâneo (entre os ciclos de congelamento com *spray* posicionado na entrada do canal).

TEMPERATURA MÁXIMA ATINGIDA (°C)			
	Ápice	1/3 Médio	1/3 Cervical
DENTE 1	28,5	27,0	30,0
DENTE 2	28,5	25,5	25,5
DENTE 3	28,5	25,5	26,0
DENTE 4	28,5	26,0	25,5
DENTE 5	29,0	26,0	26,0
DENTE 6	27,0	24,5	23,0
MÉDIAS (\pm EPM*)	28,33\pm0,2	25,75\pm0,3	26,00\pm0,9

* Erro Padrão da Média

Discussão

A crioterapia é uma técnica amplamente descrita na literatura. São utilizadas baixas temperaturas com finalidade terapêutica apresentando resultados satisfatórios em diversos tipos de lesões bucais, tanto de tecidos

moles quanto de tecidos ósseos (BEEK e BART, 1979; TURJANSKY e STOLAR, 1992; TURJANSKY e STOLAR, 1995; ISHIDA e RAMOS-e-SILVA, 1998; YEH, 2000; PRADEL, et al., 2002; JAMES, WHEAR, 2004; SCHIMDT, POGREL, 2005; FARAH e SAVAGE, 2006). Porém, há um restrito número de trabalhos experimentais e ausência de relatos clínicos, que descrevam a utilização desta modalidade terapêutica em tecidos dentários.

A eficácia da crioterapia requer que uma temperatura letal às células seja atingida, sendo estabelecido na literatura esta temperatura como -20°C (ZACARIAN e ADHAM, 1966; FRASER e GILL, 1967; POSWILLO, 1971; GETTER e PEREZ, 1972; HOLDEN e McKELVIE, 1972; CHANDLER, 1973; MILLER, 1974; LEOPARD, 1975; READE, 1979; SALMASSY e POGREL, 1995; GAGE e BAUST, 1998). Assim, esta temperatura serviria como um “monitor” da técnica, sugerindo que, quando esta é atingida, a destruição tecidual é alcançada. As médias aritméticas dos resultados do presente trabalho demonstraram que a crioterapia com nitrogênio líquido é capaz de atingir a referida temperatura no ápice e no 1/3 médio, com o *spray* posicionado a 1 mm daquele, e nos 1/3 médio e cervical, quando a ponta está posicionada na entrada do canal radicular, o que pressupõe sua efetividade para alcançar a destruição tecidual. Isto nos leva a sugerir que, em havendo células nestas regiões, estas seriam eliminadas com o protocolo aplicado nesta pesquisa, e que a crioterapia poderia ser utilizada como uma alternativa na busca da eliminação ou redução do número de microrganismos intracanal.

Os protocolos de tempos de congelamento descritos na literatura variam dependendo do tipo de sistema utilizado, *spray* ou sonda, e também de acordo com os tecidos congelados, moles ou ósseos (GETTER e PEREZ, 1972; GONGLOFF e GAGE, 1983; TURJANSKY e STOLAR, 1992; YEH, 2000; PRADEL et al., 2002; SCHIMDT, POGREL, 2004; BORGES, 2005; FARAH e SAVAGE, 2006). No entanto, para tecidos dentários não existe um protocolo de aplicação clínica definido. Smidt (2006) observou que a temperatura mínima atingida no ápice dentário é proporcional ao tempo de aplicação do criógeno, sendo que o tempo de congelamento necessário para atingir a temperatura considerada letal às células, de -20°C , foi de 15 segundos com *spray* de nitrogênio líquido. Desta maneira, para realização desta pesquisa, foi utilizado o tempo de congelamento de 15 segundos. Observamos, nos resultados, uma

média aritmética de $-36,83^{\circ}\text{C}$ e de $-38,50^{\circ}\text{C}$ no ápice dentário, após primeira e segunda aplicação de nitrogênio líquido, respectivamente. Isto indica que células presentes nesta região possivelmente seriam induzidas à necrose após o uso da crioterapia.

O intervalo entre as aplicações de nitrogênio líquido é um fator importante a ser considerado. Quanto maior o tempo de descongelamento espontâneo, maior a destruição tecidual alcançada. Além disso, o descongelamento é mais destrutivo quando completamente realizado, ou seja, quando todo o tecido é descongelado (WHITTAKER, 1978; MAZUR, 1984; GAGE e BAUST, 1998). Em 2006, Smidt detectou que o tempo necessário para que, após o congelamento de 15 segundos com *spray* de nitrogênio líquido, a temperatura dos tecidos dentários atingisse os níveis anteriores ao congelamento, foi a partir de 4 minutos. Assim, entre os ciclos de congelamento deste trabalho, foi aguardado um tempo de descongelamento espontâneo de 4 minutos. Observamos, entretanto, que as médias das temperaturas máximas atingidas entre os ciclos de congelamento ficaram todas abaixo de 36°C , o que indica que se faz necessário um maior tempo de descongelamento espontâneo ou algum aquecimento durante o descongelamento, para que as temperaturas atinjam os níveis anteriores ao primeiro congelamento.

Assim, observa-se que a crioterapia pode ter indicação para uma possível descontaminação do canal radicular, visto que as temperaturas atingidas com o protocolo aqui descrito ultrapassam, na média, a temperatura considerada crítica de -20°C . Porém, existe a necessidade de mais avaliações *in vitro* com células e também *in vivo*, em modelos animais, para que, caso os resultados persistam positivos, experimentos em humanos possam confirmar a eficácia da crioterapia no tratamento de lesões periapicais.

Referências

Beek JPH, Baart JA. Six years' experience with cryosurgery in the oral cavity. **International Journal of Oral Surgery** 1979; 8: 251-70.

Beltrão RG. **Análise clínica dos efeitos do nitrogênio líquido aplicado com hastes de algodão em lábio e palato de coelhos**. Dissertação de mestrado. Faculdade de Odontologia da PUCRS, 2003.

Borges, HOI. **Uso clínico de crioterapia com nitrogênio líquido no tratamento de hiperplasia bucal.** Dissertação de mestrado. Faculdade de Odontologia da PUCRS, 2005.

Chandler JR. Cryosurgery for recurrent carcinoma of the oral cavity. **Arch Otolaryngol** 1973; 97: 319-21.

Emmings FG, Koepf SW, Gage AA. Cryotherapy for benign lesions of the oral cavity. **Journal of Oral Surgery** 1967; 25: 320-6.

Farah CS, Savage NW. Cryotherapy for treatment of oral lesions. **Australian Dental Journal** 2006; 51(1):2-5.

Fraser J, Gill W. Observations on ultra-frozen tissue. **British Journal of Surgery** 1967; 54(9): 770-6.

Gage AA, Baust J. Mechanisms of tissue injury in cryosurgery. **Cryobiology** 1998; 37: 171-86.

Getter L, Perez B. Controlled cryotherapy in the treatment of inflammatory papillary hyperplasia. **Oral Surgery** 1972;34(2): 178-86.

Gongloff RK, Samit AM, Greene GW Jr, Inneo GF, Gage AA. Cryosurgical management of benign and dysplastic intraoral lesions. **Journal of Oral Surgery** 1980; 38: 671-6.

Gongloff RK, Gage AA. Cryosurgical treatment of oral lesions: report of cases. **Journal of American Dental Association** 1983; 106:47-51.

Holden HB, McKelvie P. Cryosurgery in the treatment of head and neck neoplasia. **Br J Surg** 1972; 59(9): 709-12.

Ishida CE, Ramos-e-Silva M. Cryosurgery in lesions. **International Journal of Dermatology** 1998; 37 (4): 283-5.

James GJ, Whear NM. K-Y jelly as an aide to cryotherapy in the management of odontogenic keratocysts. **British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery** 2004;42: 158-9.

Leopard PJ. Cryosurgery, and its application to oral surgery. **British Journal of Oral Surgery** 1975; 13(2): 128-52.

Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **Am J Physiol** 1984; 143: C125-C142.

Miller D. Cryosurgery as a therapeutic modality in treatment of tumours of the head and neck. **Proc Roy Soc Med** 1974; 67: 69-72.

Pradel W, Hlawitschka M, Eckelt U, Herzog R, Koch K. Cryosurgical treatment of genuine trigeminal neuralgia. **British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery** 2002;40: 244-7.

Poswillo D. A comparative study of the effects of electrosurgery and cryosurgery in the management of benign oral lesions. **Br J Oral Surg** 1971; 9: 1-7.

Poswillo D. Applications of cryosurgery in dentistry. **Dent Update**. 1978; 5(1): 27-30, 34-8.

Reade PC. Cryosurgery in clinical dental practice. **International Dental Journal**. 1979; 29 (1): 1-11.

Salmassy DA, Pogrel MA. Liquid nitrogen cryosurgery and immediate bone grafting in the management of aggressive primary jaw lesions. **J Oral Maxillofac Surg** 1995; 53(7): 784-90.

Santos AMB, Sant'Ana Filho M. Análise macroscópica do efeito de diferentes protocolos de nitrogênio líquido sobre a mucosa bucal: estudo em ratos. **Rev Fac. Odontol. Porto Alegre** 2002; 43(2): 18-23.

Schmidt BL, Pogrel MA. Neurosensory changes after liquid nitrogen cryotherapy. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery** 2004;62: 1183-7.

Smidt R. **Elaboração de modelo experimental para a análise *in vitro* da condutividade de dentes submetidos a variações de temperatura**. Tese de doutoramento. Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2006.

Thai K-E, Sinclair R. Cryosurgery of benign skin lesions. **Australasian Journal of Dermatology** 1999; 40: 175-86.

Turjansky E, Stolar E. **Lesiones de piel y mucosas, técnica terapéuticas**. Buenos Aires: Editorial Asociación Medica Argentina, 1995.

Turjansky E, Stolar E. Criocirurgia em lesiones de boca. **Revista de la Asociación Médica Argentina** 1992; 105(5): 22-6.

Whittaker DK. Electron microscopy of the ice crystals formed during cryosurgery: relationship to duration of freeze. **Cryobiology** 1978; 15: 603-7.

Yeh, C.-J. Simple cryosurgery treatment for oral lesions. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery** 2000; 29: 212-6.

Zacarian SA, Adham MI. Cryotherapy of cutaneous malignancy. **Cryobiology** 1966; 2(4): 212-8.

Artigo 2

Uso de crioterapia com nitrogênio líquido em dentes humanos extraídos contaminados por E. faecalis

Resumo

A crioterapia é um método efetivo de destruição tecidual por congelamento. Ela apresenta sucesso comprovado no tratamento de diversas lesões bucais, tanto em tecidos moles quanto em tecido ósseo. Procura-se, atualmente, estabelecer sua aplicação em tecidos dentários, no intuito de resolver situações clínicas de infecções periapicais recorrentes. Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar se a crioterapia, via canal dentário, apresenta efeito letal para colônias de bactérias *Enterococcus faecalis*, cultivadas em laboratórios e inoculadas em dentes humanos extraídos. O nitrogênio líquido foi aplicado em 11 dentes humanos contaminados com *E. faecalis*. Foram realizados três ciclos de 60 segundos de congelamento, intercalados por períodos de descongelamento de 4 minutos. A média aritmética das porcentagens de redução do número de UFC de *E. faecalis*, foi de $92,00 \pm 3,117$ (média \pm erro padrão da média). Pode-se concluir deste trabalho que a crioterapia foi efetiva na redução do número de bactérias intracanal, podendo apresentar uma eficácia na descontaminação do canal radicular.

Introdução

A crioterapia é um método efetivo de destruição tecidual por congelamento e tem sido utilizada no tratamento de diversas lesões bucais, tanto em tecidos moles quanto em tecido ósseo (EMMINGS, KOEPF e GAGE, 1967; WHITTAKER, 1975; GONGLOFF e GAGE, 1983; TAL e RIFKIN, 1986; TAL, 1992; ISHIDA e RAMOS-e-SILVA, 1998; YEH, 2000; SCHIMDT, POGREL, 2004). Sua aplicação promove uma destruição tecidual controlada e não-seletiva, ocorrendo após ciclos de congelamento e descongelamento lento (EMMINGS, KOEPF e GAGE, 1967; LEOPARD, 1975; GONGLOFF e GAGE, 1983; GAGE e BAUST, 1998).

Frente a este comprovado sucesso, procura-se estabelecer sua aplicação em tecidos dentários, em situações que possam otimizar resultados clínicos, que hoje possam estar comprometidos. As bactérias são o principal fator das infecções pulpares e periapicais refratárias ao tratamento endodôntico e a falha em sua remoção pode resultar em irritação persistente ou cicatrização inadequada. Além disso, estudos mostram que bactérias vivas podem

permanecer no sistema de canais mesmo após o preparo químico-mecânico (MÖLLER et al., 1981; MOLANDER et al., 1998).

Os microrganismos encontrados nos dentes tratados endodonticamente são decorrentes de fatores de seleção que determinam a persistência das bactérias capazes de resistir aos procedimentos antimicrobianos e medicamentos utilizados na terapia endodôntica e de sobreviver em um meio escasso de nutrientes (SUNDQVIST et al., 1998). Vários autores demonstraram a presença de *Enterococcus faecalis* em infecções endodônticas (ENGSTRÖM, 1964; MOLANDER et al., 1998; SUNDQVIST et al., 1998; PECIULIENE et al., 2000). Os *E. faecalis* têm a capacidade de invadir os túbulos dentinários, podendo facilitar sua fuga aos procedimentos químico-mecânicos. Esses microrganismos também têm demonstrado resistência ao hidróxido de cálcio, medicamento comumente utilizado para descontaminação dos canais radiculares (HAAPASALO e ORSTAVIK, 1987). A importância do enterococo deve-se, ainda, à sua capacidade de desenvolver resistência aos antimicrobianos comumente utilizados (MURRAY, 1990), sendo freqüentemente indicados para verificar a eficácia de irrigantes e medicamentos em endodontia.

Existem poucas pesquisas que abordam o efeito controlador do frio em bactérias, principalmente com a intenção de evitar sua proliferação. A fim de verificar o efeito da queda brusca e intensa da temperatura nestes microrganismos, Batista (2006) observou a redução parcial de colônias de *Enterococcus faecalis* cultivadas *in vitro*, pela aplicação de N₂ líquido na forma de *spray*.

Assim, o objetivo desta pesquisa foi verificar, *in vitro*, se a aplicação do *spray* de N₂ líquido, via canal dentário, tem efeito letal para as colônias de bactérias *Enterococcus faecalis*, cultivadas em laboratórios e inoculadas em dentes humanos extraídos.

Material e método

A realização da pesquisa foi iniciada após a aprovação do projeto (protocolo n° 94/06) pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. A amostra foi composta por doze dentes

humanos uniradiculares extraídos devido indicação ortodôntica. Realizou-se a abertura coronária e instrumentação com o auxílio de limas endodônticas numa seqüência progressiva de diâmetro até a lima nº 60, sendo o canal irrigado com soro fisiológico 0,9% durante a instrumentação. Os dentes foram esterilizados em autoclave, a 121°C, durante 30 minutos. No início do experimento, foi realizado um controle de esterilidade, introduzindo um dos dentes autoclavados para o interior de um tubo de ensaio contendo caldo nutritivo. Logo após, o tubo foi colocado em uma estufa bacteriológica a 36°C por um período de 18 a 24 horas, comprovando a esterilidade do dente.

A contaminação dos dentes foi realizada no Laboratório de Microbiologia Clínica da Faculdade de Farmácia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Para contaminação dos elementos dentários utilizou-se um protocolo adaptado de Er *et al* (2005). Como inóculo inicial foi usada uma suspensão com turbidez correspondente a 0,5 na escala de Mac Farland, obtida da cultura de *Enterococcus faecalis* (ATCC 51299). A partir desta suspensão, foi realizado um teste de viabilidade bacteriana, repicando a suspensão com auxílio de uma alça bacteriológica, para a superfície de uma placa de ágar sangue e incubada por 18 a 24 horas a uma temperatura de 36°C. Este processo permitiu a visualização de bactérias viáveis (*controle positivo*) comprovando a presença de bactérias vivas na suspensão inicial.

Uma amostra de 0,1 mL do inóculo inicial foi introduzida no interior do canal radicular, por meio de seringa de insulina estéril, sendo aspirada logo em seguida. O uso do cone de papel foi adaptado de Gulabivala *et al* (2004) e Gomes *et al* (2006). Procedeu-se à secagem do canal com cone de papel estéril, durante 30 segundos, sendo este cone imediatamente rolado, com o auxílio de uma pinça clínica, pela superfície de uma placa de ágar sangue. Foram usados tantos cones quanto necessários para completa secagem do canal. Esta placa foi identificada com o número do dente correspondente, mais a marcação “pré” e levada para incubação por 18 a 24 horas a uma temperatura de 36°C (contagem pré-congelamento). Esta etapa foi realizada em cada elemento dentário.

Após este procedimento foi realizada a aplicação de nitrogênio líquido no interior do canal radicular, através do criostato CRY-AC®-3. Também foi utilizada uma agulha descartável de 0,7 mm de diâmetro por 25 mm de

comprimento com adaptador Luer Lock (#308). O tempo de congelamento foi de 60 segundos, com a ponta da agulha posicionada a 1 mm aquém do ápice. Após a aplicação do nitrogênio líquido, o dente foi levado para a estufa, a 36°C, onde se aguardou um tempo de aquecimento de 4 minutos. Em seguida, foi repetido o ciclo de congelamento e aquecimento, com as mesmas durações e intervalos, por duas vezes, totalizando três aplicações do criógeno.

Finalizados os três ciclos, um novo cone de papel estéril foi introduzido no interior do canal por 30 segundos, sendo este cone imediatamente rolado, com o auxílio de uma pinça, sobre a superfície de uma placa de ágar sangue. Esta placa foi identificada com o número do dente correspondente, mais a marcação “pós”, e levada para incubação por 18 a 24 horas a uma temperatura de 36°C (contagem pós-congelamento), sendo este processo repetido para cada dente.

Passado o período de incubação, realizou-se a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) nas placas “pré” e “pós”. O número total de colônias foi estimado, mediante regra de três simples, baseando-se pelo número de unidades formadoras de colônias em uma das 8 áreas demarcadas, a partir da divisão da placa de Petry por retas de 9 cm de comprimento, todas passando pelo centro da placa de diâmetro 9 cm (Figura 1). Em alguns casos, quando o número de UFC foi menor que 100, foi realizada a contagem de todas as colônias presentes, sem uso da regra de três.

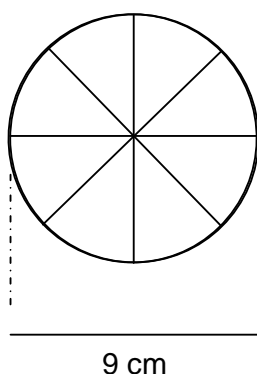


Figura 1: Representação do procedimento de contagem do número de UFC, para a estimativa do número de colônias de *E. faecalis* na superfície do meio ágar-sangue.

Em nossos experimentos anteriores, foram realizadas tentativas de se utilizar três ciclos de congelamento de 15 e 30 segundos, e também três ciclos

de 60 segundos com descongelamento espontâneo (sem estufa). Em nenhuma destas tentativas o resultado foi eficaz, ou seja, a porcentagem de redução do número de bactérias não foi reduzida de forma significativa.

Numa segunda parte do estudo, foi realizada a mensuração da temperatura atingida pela aplicação do nitrogênio líquido nos tecidos dentários. A metodologia empregada foi semelhante à do trabalho de Borges *et al* (2007), sendo a aferição possibilitada por meio do uso do modelo experimental desenvolvido por Smidt (2006). As variações de temperatura foram aferidas nas regiões do ápice, 1/3 médio e 1/3 cervical. Os dentes foram submetidos ao mesmo tempo de aplicação de nitrogênio líquido do protocolo descrito anteriormente (3 ciclos de congelamento de 60 segundos, intercalados por períodos de descongelamento espontâneo de 4 minutos).

As médias das temperaturas atingidas foram dispostas na forma de tabelas, para melhor visualização dos resultados obtidos, sendo calculadas as porcentagens de redução do número de UFC.

Resultados

Após o período de incubação, as placas de Petry de todos os dentes foram visualizadas para contagem do número de UFC (Figuras 2A e 2B).

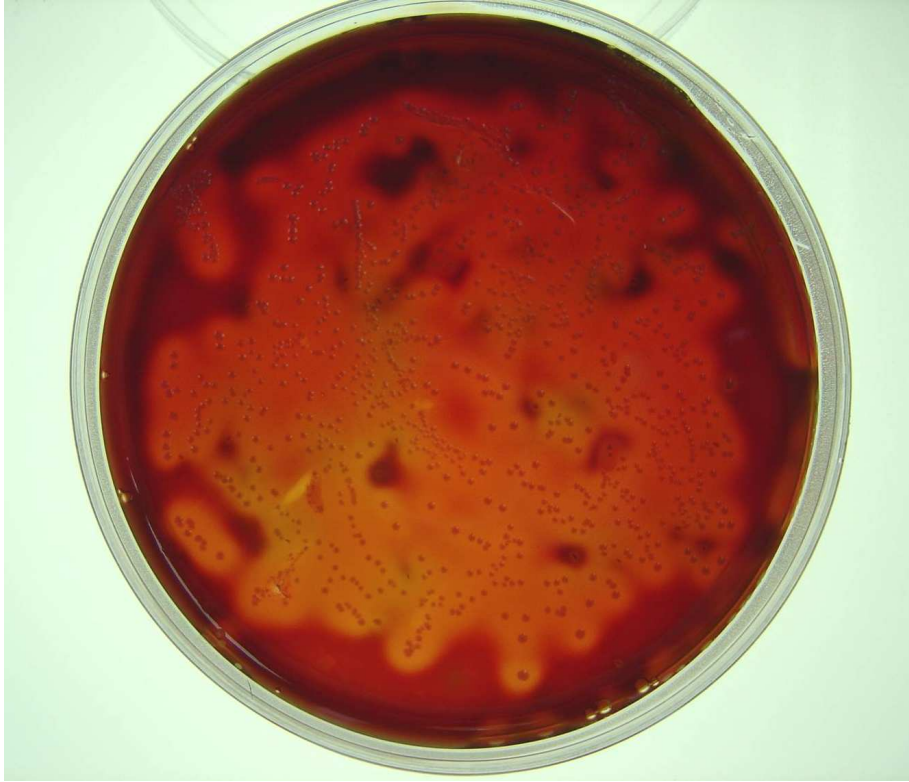


Figura 2A: contagem de UFC do dente 1 pré-congelamento.

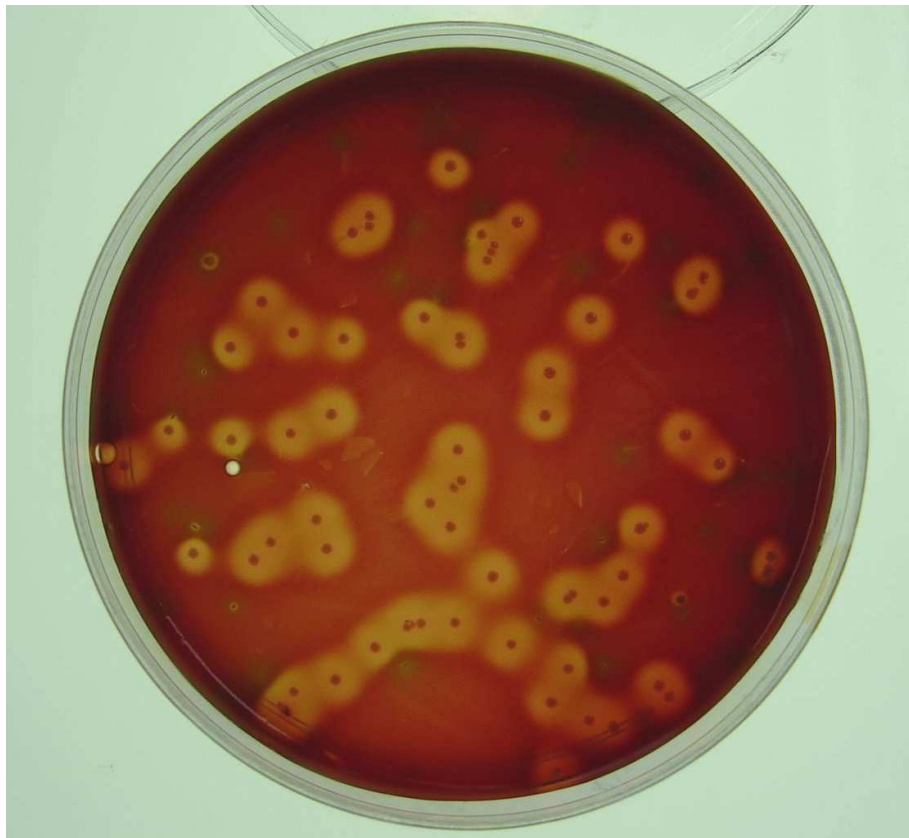


Figura 2B: contagem de UFC do dente 1, pós-congelamento, evidenciando a redução do número de colônias bacterianas.

Os números de UFC, antes e após o congelamento com nitrogênio líquido, bem como as porcentagens de redução destas colônias, estão representados na Tabela 1. Antes do congelamento, houve uma variação entre 424 e 2240 na contagem de UFC, enquanto a contagem após os três ciclos de aplicação do nitrogênio líquido variou entre 12 e 296 UFC (Gráfico 1).

NÚMERO DE UFC			
DENTE	Contagem PRÉ	Contagem PÓS	% de redução
1	800	66	91,75
2	2016	53	97,37
3	2044	296	85,51
4	1764	33	98,12
5	1256	34	97,29
6	1272	146	88,52
7	2240	22	99,01
8	800	290	63,75
9	736	20	97,28
10	424	12	97,16
11	936	35	96,26

Tabela 1: número de UFC, antes e após a aplicação do nitrogênio líquido, e suas porcentagens de redução.

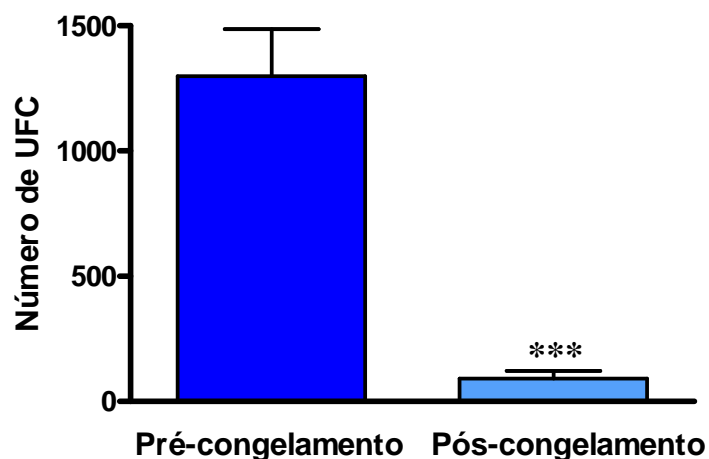


Gráfico 1: Médias das contagens de UFC pré e pós congelamento, evidenciando a redução do número de colônias bacterianas. (***) $P < 0,0001$

As porcentagens de redução do número de UFC, após o congelamento, oscilaram entre 63,75 e 99,01%. A média aritmética destas porcentagens foi de $92,00 \pm 3,117$ (média \pm erro padrão da média).

Os dados foram analisados através do teste *t* de Student para amostras pareadas, sendo encontrado uma redução com significância estatística, com $P < 0,0001$.

Em relação à segunda parte do estudo, as temperaturas mínimas variaram, em graus Celsius, entre -141,00 e -30,00 no ápice dentário, entre -116,00 e -27,00 no 1/3 médio e entre -72,00 e 08,00 no 1/3 cervical. As médias aritméticas, calculadas entre todos os dentes submetidos ao experimento, oscilaram entre -115,54°C e -118,27°C, entre -76,54°C e -71,72°C, e entre -31,00°C e -28,18°C, nas regiões do ápice, 1/3 médio e 1/3 cervical, respectivamente (Tabela 2).

TEMPERATURA MÍNIMA ATINGIDA (°C)									
	PRIMEIRO CONGELAMENTO			SEGUNDO CONGELAMENTO			TERCEIRO CONGELAMENTO		
	Ápice	1/3 Médio	1/3 Cervical	Ápice	1/3 Médio	1/3 Cervical	Ápice	1/3 Médio	1/3 Cervical
DENTE 1	-136	-92	-30	-136	-94	-31	-136	-88	-32
DENTE 2	-141	-85	-67	-141	-93	-72	-140	-86	-65
DENTE 3	-119	-73	-16	-136	-100	-28	-135	-89	-22
DENTE 4	-126	-81	-66	-126	-80	-66	-123	-79	-63
DENTE 5	-58	-57	-09	-56	-60	-09	-30	-41	-04
DENTE 6	-115	-66	-12	-120	-70	-17	-127	-76	-18
DENTE 7	-134	-68	-12	-134	-74	-19	-132	-64	-15
DENTE 8	-132	-55	-19	-132	-58	-19	-140	-63	-14
DENTE 9	-49	-35	05	-35	-27	08	-76	-43	01
DENTE 10	-135	-108	-66	-136	-116	-67	-134	-105	-61
DENTE 11	-126	-69	-18	-124	-70	-21	-128	-68	-18
MÉDIAS (± erro padrão da média)	-115,54±9,54	-71,72±5,94	-28,18±7,80	-116,00±10,76	-76,54±7,29	-31,00±7,86	-118,27±10,33	-72,90±5,91	-28,27±7,20

Tabela 2: Médias das temperaturas mínimas atingidas, em graus Celsius, após os ciclos de congelamento com nitrogênio líquido, com *spray* posicionado a 1 mm do ápice.

Discussão

Em Odontologia, as lesões periapicais crônicas representam uma situação que pode evoluir de maneira indesejada. Caso não haja uma resolução adequada do problema, um procedimento de cirurgia periapical precisa ser realizado para remoção dos agentes irritantes locais. Dentro de uma concepção não invasiva, um tratamento conservador que consiga eliminar os microrganismos causadores da infecção seria o ideal para o paciente. Antes de realizar a aplicação de uma nova técnica *in vivo*, ela precisa ser fundamentada por estudos *in vitro* e em modelos animais. Assim, em busca de maneiras para “esterilizar” o sistema de canais radiculares, Smidt (2006) idealizou um modelo experimental para verificar as temperaturas atingidas em diferentes regiões do dente após aplicação da crioterapia com nitrogênio líquido. Nossa pesquisa deu seguimento a este trabalho, confeccionando um protocolo para aplicação da técnica de crioterapia com nitrogênio líquido em dentes humanos contaminados.

Uma das principais causas para o insucesso da eliminação de lesões periapicais é a permanência de microrganismos no sistema de canais radiculares, principalmente no ápice dentário. Desta maneira, a *E. faecalis* foi escolhida para a pesquisa por ser uma das bactérias mais comumente isoladas dos canais radiculares em casos de falha do tratamento endodôntico (SUNDQVIST et al., 1998; PECIULIENE et al., 2000; HANCOCK III et al., 2001; PINHEIRO et al., 2006).

Muitas pesquisas mostram a tentativa de se encontrar um agente para irrigação intracanal que consiga eliminar as bactérias presentes em dentes contaminados, como o gel de digluconato de clorexidina a 2%, o dióxido de cloro, o hipoclorito de sódio associado ou não ao EDTA ou a clorexidina a 1% associada a hidróxido de cálcio (GOMES et al., 2003; EDDY et al., 2005; ÖNÇAG et al., 2006; KHO e BAUMGARTNER, 2006). Estes trabalhos demonstram que, quando efetivo, o agente irrigador necessita de muito tempo de contato com o microrganismo, o que inviabiliza seu sucesso na clínica diária. Nosso estudo demonstrou que a crioterapia foi capaz de eliminar, na média, 92% dos microrganismos *E. faecalis* nos canais radiculares, após aplicação de 3 ciclos de congelamento. O tempo necessário para uso desta técnica indica sua viabilidade de aplicação clínica. Além do mais, uma vez que o número de microrganismos seja reduzido em tamanha proporção, é esperado

que as próprias defesas do organismo tenham maior facilidade em eliminar o agente injuriante.

A técnica de crioterapia é utilizada em tecidos moles e ósseos, comumente, por meio da aplicação de dois ou três ciclos de congelamento, intercalados por um período de descongelamento espontâneo (EMMINGS, KOEPF e GAGE, 1967; HURT, NABERS e ROSE, 1972; LEOPARD, 1975; POSWILLO, 1978; GONGLOFF e GAGE, 1983; GAGE e BAUST, 1998; FARAH e SAVAGE, 2006). Entretanto, tentativas de utilizar somente dois ciclos de congelamento, nesta pesquisa, não promoveram nenhum tipo de alteração do número de UFC. Já os resultados após 3 ciclos de aplicação, como ilustrado na Tabela 1, promoveram uma redução significativa do número de UFC, com média de 92% de redução. Assim, para tecidos dentários contaminados com *E. faecalis*, fica evidente a necessidade de 3 ciclos de congelamento com nitrogênio líquido.

Neste estudo, a crioterapia mostrou-se eficaz como agente redutor de bactérias intracanal, apresentando-se como uma opção efetiva para controle de bactérias em infecções periapicais recorrentes. Esta técnica não pretende ser substituta e sim adjuvante à terapia endodôntica, principalmente frente à presença de microorganismos resistentes. Isto ocorre porque o congelamento com nitrogênio líquido pode atingir locais onde o preparo biomecânico, juntamente com o uso de soluções irrigadoras, não atinge. Sugere-se, porém, a necessidade de experimentos em modelo animal, para observação do comportamento dos tecidos de sustentação dos dentes após a aplicação dos ciclos de congelamento, antes da verificação *in vivo* da eficácia da técnica.

Referências

Batista PS. **Análise do efeito do spray de nitrogênio líquido em culturas de bactérias *Enterococcus faecalis* – estudo *in vitro***. Tese de doutoramento. Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2006.

Borges HOI, Smidt R, Sant'Ana Filho M. Efeito da crioterapia em dentes humanos: um estudo *in vitro*. 2007. (dados não publicados)

Eddy RS, Joyce AP, Roberts S, Buxton TB, Liewehr F. An in vitro evaluation of the antibacterial efficacy of chlorine dioxide on *E. faecalis* in bovine incisors. **JOE** 2005; 31(9): 672-5.

Emmings FG, Koepf SW, Gage AA. Cryotherapy for benign lesions of the oral cavity. **Journal of Oral Surgery** 1967; 25: 320-6.

Engström B, Frostell G. Experiences of bacteriological root canal control. **Acta Odontol Scand** 1964; 22: 43-69.

Er K, Sümer Z, Akpınar KE. Apical extrusion of intracanal bacteria following use of two engine-driven instrumentation techniques. **International Endodontic Journal** 2005; 38: 871-6.

Gomes BPPFA, Souza SFC, Ferraz CCR, Teixeira FB, Zaia AA, Valdrighi L, Souza-Filho FJ. Effectiveness of 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis* in bovine root dentine *in vitro*. **International Endodontic Journal** 2003; 36: 267-75.

Gomes BPPFA, Pinheiro ET, Sousa ELR, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CCR, Souza-Filho FJ. *Enterococcus faecalis* in dental root canals detected by culture and by polymerase chain reaction analysis. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod** 2006; 102: 247-53.

Gage AA, Baust J. Mechanisms of tissue injury in cryosurgery. **Cryobiology** 1998; 37: 171-86.

Gongloff RK, Gage AA. Cryosurgical treatment of oral lesions: report of cases. **Journal of American Dental Association** 1983; 106:47-51.

Gulabivala K, Stock CJR, Lewsey JD, Ghori S, Ng Y-L, Spratt DA. Effectiveness of electrochemically activated water as an irrigant in an infected tooth model. **International Endodontic Journal** 2004; 37: 624-31.

Haapasalo M, Orstavik D. In vitro infection and disinfection of dentinal tubules. **J Dent Res** 1987; 66(8):1375-9.

Hancock III HH, Sigurdsson A, Trope M, Moiseiwitsch J, Hill C. Bacteria isolated after unsuccessful endodontic treatment in a North American population. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod** 2001; 91: 579-86.

Ishida CE, Ramos-e-Silva M. Cryosurgery in lesions. **International Journal of Dermatology** 1998; 37 (4): 283-5.

Kho P, Baumgartner JC. A comparison of the antimicrobial efficacy of NaOCl/Biopure MTAD versus NaOCl/EDTA against *Enterococcus faecalis*. **JOE** 2006; 32(7): 652-5.

Leopard PJ. Cryosurgery, and its application to oral surgery. **British Journal of Oral Surgery** 1975; 13(2): 128-52.

Möller AJR, Fabricius L, Dahlén G, Öhman AE, Heyden G. Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. **Scand J Dent Res** 1981; 89: 475-84.

Molander A, Reit C, Dahlén G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. **Int Endod J** 1998; 31(1): 1-7.

Murray BE. The life and times of the Enterococcus. **Clin Microbiol Rev** 1990; 3(1): 46-65.

Onçag Ö, Gogulu D, Uzel A. Efficacy of various intracanal medicaments against *Enterococcus faecalis* in primary teeth: An *in vivo* study. **The Journal of Clinical Pediatric Dentistry** 2006; 30(3): 233-7.

Peciuliene V, Balciuniene I, Eriksen HM, Haapasalo M. Isolation of *Enterococcus faecalis* in previously root-filled canals in a Lithuanian population. **J Endod** 2000; 26(10): 593-5.

Pinheiro ET, Anderson MJ, Gomes BPF, Drucker DB. Phenotypic and genotypic identification of enterococci isolated from canals of root-filled teeth with periapical lesions. **Oral Microbiol Immunol** 2006; 21: 137-44.

Schimdt BL, Pogrel MA. Neurosensory changes after liquid nitrogen cryotherapy. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery** 2004;62: 1183-7.

Smidt R. **Elaboração de modelo experimental para a análise *in vitro* da condutividade de dentes submetidos a variações de temperatura.** Tese de doutoramento. Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2006.

Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod** 1998; 85(1): 86-93.

Tal H. Cryosurgical treatment of hemangiomas of the lip. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology** 1992; 73 (6): 650-4.

Tal H, Rifkin B. Cryosurgical treatment of gingival lichen planus: report of a case. **Journal of American Dental Association** 1986; 113(4): 629-31.

Whitaker DK. Ultrastructural changes in the microvasculature following cryosurgery of oral mucosa. **Journal of Periodontal Research** 1975; 10: 148-57.

Yeh, C.-J. Simple cryosurgery treatment for oral lesions. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery** 2000; 29: 212-6.

3. DISCUSSÃO

3. Discussão

Os trabalhos utilizando crioterapia com nitrogênio líquido vêm sendo desenvolvidos na Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul desde o ano de 2002. Inicialmente Santos (2002) avaliou morfológicamente o efeito de diferentes protocolos de aplicação de nitrogênio líquido em mucosa bucal de ratos. Observou ao microscópio, após aplicação de ciclos de 20 segundos de congelamento, que o nitrogênio líquido provocou degeneração hidrópica, úlcera e necrose tecidual.

Em 2003, Beltrão observou clinicamente o uso de nitrogênio líquido em lábios e palatos de coelhos. Utilizou ciclos de congelamento de um minuto. Os resultados mostraram necrose em todas as aplicações, com reparo tecidual em torno do 14º dia. Entre suas conclusões, afirma que o protocolo utilizado é efetivo para promover necrose tecidual e que a extensão do dano depende do local de aplicação.

Também em 2003, Silva analisou histologicamente o efeito do nitrogênio líquido em mandíbula de coelhos. Utilizou ciclos de congelamento de 10 segundos, com intervalo de 2,5 minutos entre eles. Concluiu que a crioterapia causa necrose nas paredes ósseas e não interfere com o processo de reparo.

Aplicando clinicamente a crioterapia em tecidos moles, Borges (2005) avaliou o uso da crioterapia no tratamento da hiperplasia bucal, uma resposta à irritação crônica de baixa intensidade freqüentemente associada ao uso de próteses. Avaliou também a dor trans e pós-operatória durante este tratamento. Concluiu que a crioterapia: mostrou-se um método eficiente para o tratamento de lesões hiperplásicas bucais pediculadas com até 12 mm de comprimento; é um procedimento de rápida execução e pode ser considerada um método indolor tanto no trans como no pós-operatório.

Batista, em 2006, observou *in vitro* o efeito do nitrogênio líquido em bactérias *Enterococcus faecalis*. Utilizou diferentes protocolos, variando o número de aplicações, com a presença ou não de um dispositivo que acelerava o descongelamento. Concluiu que a crioterapia reduziu o crescimento, *in vitro*, de *Enterococcus faecalis*, sendo o melhor resultado obtido com a aplicação de 2 ciclos de congelamento de 120 segundos cada, com descongelamento de 120 segundos e repetição após 12 horas.

Iniciando as pesquisas em tecidos dentários, Smidt (2006) elaborou um modelo experimental *in vitro* para conhecer o comportamento dos tecidos dentários na condução de temperatura com aplicação de nitrogênio líquido intracanal. Concluiu que o modelo experimental permite conhecer a condutividade das estruturas dentárias. Também verificou que a aplicação de N₂ líquido por 15 segundos atinge temperaturas capazes de causar morte celular.

Por isso, numa seqüência lógica de raciocínio, o presente estudo buscou aprofundar o conhecimento sobre crioterapia em tecidos dentários, favorecendo a execução de outros trabalhos. O objetivo final desta série de pesquisas é chegar à aplicação clínica da crioterapia para resolver problemas de infecções periapicais que necessitem de cirurgia do periápice. Por este motivo existe, de fato, a evidência de uma aplicabilidade clínica, desde que os resultados em modelos animais comprovem sua eficácia, o que engrandece a importância do trabalho. Os resultados deste estudo fornecem uma base para que o seguimento desta linha de pesquisa seja justificado. Porém, várias situações necessitam de averiguação. Nesta pesquisa não houve motivo verificado para alteração existente dos valores de temperaturas entre o dente 1 e os outros dentes, como observado na Tabela 1 (Artigo 1). Os experimentos seguiram o mesmo protocolo de realização, não sendo possível observar uma justificativa para tal diferença.

Outra questão diz respeito aos resultados dos dentes usados no primeiro artigo não diferirem dos resultados encontrados com os outros elementos dentários. Assim, não é possível inferir que possa haver qualquer alteração nos resultados pelo motivo do dente já ter sido submetido à aplicação prévia de nitrogênio líquido. Além disso, vale ressaltar que os dentes foram utilizados repetidas vezes, para realização de todas as etapas experimentais. Alguns destes elementos apresentaram alterações visíveis a olho nu, como rachaduras ou trincas. Isto sugere que a crioterapia pode causar um dano evidente à estrutura dentária, desde que aplicada por várias vezes no mesmo elemento dentário. Como na clínica a aplicação deve ser única, de apenas 3 ciclos, esta fragilidade provavelmente não ocorrerá. Obviamente, tal ponto de vista deve ser averiguado por meio de pesquisas que submetam o dente, após ciclos de congelamento, a testes de tração a fim de constatar uma possível fragilidade desta estrutura dentária. Também se faz necessária a investigação dos efeitos deste congelamento nos tecidos de

sustentação do dente, através de análise microscópica, tanto em tecidos moles como em tecido ósseo, pois uma vez que a crioterapia causa necrose em tecidos moles (SANTOS, 2002; BORGES, 2005) e osso (SILVA, 2003; SCORTEGAGNA, 2004) pode lesar os tecidos responsáveis pela manutenção do elemento dentário no alvéolo.

Apesar de a literatura indicar que a temperatura letal para as células é de -20°C (ZACARIAN e ADHAM, 1966; FRASER e GILL, 1967; POSWILLO, 1971; GETTER e PEREZ, 1972; HOLDEN e McKELVIE, 1972; CHANDLER, 1973; MILLER, 1974; LEOPARD, 1975; READE, 1979; SALMASSY, POGREL, 1995; GAGE e BAUST, 1998), o que pode ser obtido, segundo Smidt (2006), com 15 segundos de congelamento, o observado nos resultados desta pesquisa foi que é necessário um período maior de congelamento para que haja morte de bactérias *E. faecalis*. Isto nos mostra que o tempo de congelamento suficiente para causar morte celular difere daquele necessário para ocasionar a morte das citadas bactérias. Além do mais, em se tratando de lesões periapicais que reconhecidamente apresentam diferentes tipos de bactérias, deve-se pesquisar se toda a microbiota comumente presente numa lesão periapical não possui uma maior resistência aos efeitos do congelamento, do que apenas um tipo de bactéria isolada.

Foi observado, neste trabalho, que a temperatura após o tempo de descongelamento espontâneo de 4 minutos não atingiu os níveis anteriores ao primeiro congelamento, que eram próximos de 36°C. Pode ser investigado se um aumento do tempo de espera associado a uma diminuição do tempo de congelamento não seria capaz de atingir o mesmo resultado desta pesquisa. O que precisa ser enfatizado é que, como a intenção é de se aplicar o protocolo na clínica, em termos de viabilidade, o tempo de todo o ciclo não deve ser demasiadamente longo.

E por fim, antes da aplicação em seres humanos, faz-se necessário a verificação do uso da crioterapia em lesões periapicais induzidas, em modelos animais. Resultados positivos nesta última etapa proporcionariam promissores indícios de resultados satisfatórios em lesões periapicais em humanos.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

4. Considerações finais

Com base nos resultados obtidos, a partir das metodologias aplicadas, pode-se inferir que a aplicação de crioterapia com nitrogênio líquido:

- É capaz de atingir temperaturas consideradas letais no ápice dentário e 1/3 médio, com a ponta do *spray* posicionada a 1 mm do ápice;

- Atingiu temperaturas consideradas letais nos terços médio e cervical, com a ponta do *spray* posicionado na entrada do canal;

- Proporcionou, em média, 92% de redução no número de UFC de bactérias *E. faecalis*, em dentes extraídos contaminados.

5.REFERÊNCIAS

5. Referências³

BATISTA PS. **Análise do efeito do spray de nitrogênio líquido em culturas de bactérias *Enterococcus faecalis* – estudo *in vitro***. Tese de doutoramento. Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2006.

BEEK JPH, BAART JA. Six years' experience with cryosurgery in the oral cavity. **International Journal of Oral Surgery** 1979; 8: 251-70.

BELTRÃO RG. **Análise clínica dos efeitos do nitrogênio líquido aplicado com hastes de algodão em lábio e palato de coelhos**. Dissertação de mestrado. Faculdade de Odontologia da PUCRS, 2003.

BIAZOLA ER, MORAES NP. Crioterapia em lesões leucoplásicas da boca: um estudo em humanos. **Revista Brasileira de Odontologia** 1995; 52(1): 16-8.

BORGES HOI. **Uso clínico de crioterapia com nitrogênio líquido no tratamento de hiperplasia bucal**. Dissertação de mestrado. Faculdade de Odontologia da PUCRS, 2005.

BORGES HOI, SMIDT R, SANT'ANA FILHO M. Efeito da crioterapia em dentes humanos: um estudo *in vitro*. 2007 (dados não publicados)

CERQUEIRA A, SANT'ANA FILHO M. Margem de segurança com crioterapia após curetagem de lesões recidivantes maxilomandibulares: relato de caso. **Revista Brasileira de Cirurgia e Implantodontia** 2001; 8 (31): 193-6.

CHANDLER JR. Cryosurgery for recurrent carcinoma of the oral cavity. **Arch Otolaryngol** 1973; 97: 319-21.

EDDY RS, JOYCE AP, ROBERTS S, BUXTON TB, LIEWEHR F. An in vitro evaluation of the antibacterial efficacy of chlorine dioxide on *E. faecalis* in bovine incisors. **JOE** 2005; 31(9): 672-5.

EMMINGS FG, KOEPF SW, GAGE AA. Cryotherapy for benign lesions of the oral cavity. **Journal of Oral Surgery** 1967; 25: 320-6.

ENGSTRÖM B, FROSTELL G. Experiences of bacteriological root canal control. **Acta Odontol Scand** 1964; 22: 43-69.

ER K, SÜMER Z, AKPINAR KE. Apical extrusion of intracanal bacteria following use of two engine-driven instrumentation techniques. **International Endodontic Journal** 2005; 38: 871-6.

³Referências dispostas segundo as normas de formatação da ABNT (NBR 6023, NBR 14724, NBR,10520).

FARAH CS, SAVAGE NW. Cryotherapy for treatment of oral lesions. **Australian Dental Journal** 2006; 51(1):2-5.

FERRER BERNAT J. Criocirurgia. Avanços recientes. **Dermatologia Rev Mex** 1993; 37(2): 96-8.

FRASER J, GILL W. Observations on ultra-frozen tissue. **British Journal of Surgery** 1967; 54(9): 770-6.

GAGE AA, BAUST J. Mechanisms of tissue injury in cryosurgery. **Cryobiology** 1998; 37: 171-86.

GETTER L, PEREZ B. Controlled cryotherapy in the treatment of inflammatory papillary hyperplasia. **Oral Surgery** 1972;34(2): 178-86.

GOMES BPFA, SOUZA SFC, FERRAZ CCR, TEIXEIRA FB, ZAIA AA, VALDRIGHI L, SOUZA-FILHO FJ. Effectiveness of 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis* in bovine root dentine *in vitro*. **International Endodontic Journal** 2003; 36: 267-75.

GOMES BPFA, PINHEIRO ET, SOUSA ELR, JACINTO RC, ZAIA AA, FERRAZ CCR, SOUZA-FILHO FJ. *Enterococcus faecalis* in dental root canals detected by culture and by polymerase chain reaction analysis. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod** 2006; 102: 247-53.

GONGLOFF RK, SAMIT AM, GREENE GW JR, INNEO GF, GAGE AA. Cryosurgical management of benign and dysplastic intraoral lesions. **Journal of Oral Surgery** 1980; 38: 671-6.

GONGLOFF RK, GAGE AA. Cryosurgical treatment of oral lesions: report of cases. **Journal of American Dental Association** 1983; 106:47-51.

GULABIVALA K, STOCK CJR, LEWSEY JD, GHORI S, NG Y-L, SPRATT DA. Effectiveness of electrochemically activated water as an irrigant in an infected tooth model. **International Endodontic Journal** 2004; 37: 624-31.

HAAPASALO M, ORSTAVIK D. In vitro infection and disinfection of dentinal tubules. **J Dent Res** 1987; 66(8):1375-9.

HANCOCK III HH, SIGURDSSON A, TROPE M, MOISEWITSCH J, HILL C. Bacteria isolated after unsuccessful endodontic treatment in a North American population. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod** 2001; 91: 579-86.

HOLDEN HB, MCKELVIE P. Cryosurgery in the treatment of head and neck neoplasia. **Br J Surg** 1972; 59(9): 709-12.

HURT WC, NABERS CL, ROSE GG. Some clinical and histologic observations of gingiva treated by cryotherapy. **Journal of Periodontology** 1972; 43 (3): 151-6.

ISHIDA CE, RAMOS-E-SILVA M. Cryosurgery in lesions. **International Journal of Dermatology** 1998; 37 (4): 283-5.

JAMES GJ, WHEAR NM. K-Y jelly as an aide to cryotherapy in the management of odontogenic keratocysts. **British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery** 2004;42: 158-9.

KHO P, BAUMGARTNER JC. A comparison of the antimicrobial efficacy of NaOCl/Biopure MTAD versus NaOCl/EDTA against *Enterococcus faecalis*. **JOE** 2006; 32(7): 652-5.

LEMOS JÚNIOR CA. **Criocirurgia em lesões benignas da mucosa bucal; revisão da literatura e sua avaliação clínica em 37 casos**. Dissertação de mestrado. Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, 1999.

LEOPARD PJ. Cryosurgery, and its application to oral surgery. **British Journal of Oral Surgery** 1975; 13(2): 128-52.

MAZUR P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **Am J Physiol** 1984; 143: C125-C142.

MILLER D. Cryosurgery as a therapeutic modality in treatment of tumours of the head and neck. **Proc Roy Soc Med** 1974; 67: 69-72.

MOLANDER A, REIT C, DAHLÉN G, KVIST T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. **Int Endod J** 1998; 31(1): 1-7.

MÖLLER AJR, FABRICIUS L, DAHLÉN G, ÖHMAN AE, HEYDEN G. Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. **Scand J Dent Res** 1981; 89: 475-84.

MURRAY BE. The life and times of the Enterococcus. **Clin Microbiol Rev** 1990; 3(1): 46-65.

ONÇAG Ö, GOGULU D, UZEL A. Efficacy of various intracanal medicaments against *Enterococcus faecalis* in primary teeth: An *in vivo* study. **The Journal of Clinical Pediatric Dentistry** 2006; 30(3): 233-7.

PECIULIENE V, BALCIUNIENE I, ERIKSEN HM, HAAPASALO M. Isolation of *Enterococcus faecalis* in previously root-filled canals in a Lithuanian population. **J Endod** 2000; 26(10): 593-5.

PINHEIRO ET, ANDERSON MJ, GOMES BPFA, DRUCKER DB. Phenotypic and genotypic identification of enterococci isolated from canals of root-filled teeth with periapical lesions. **Oral Microbiol Immunol** 2006; 21: 137-44.

PRADEL W, HLAWITSCHKA M, ECKELT U, HERZOG R, KOCH K. Cryosurgical treatment of genuine trigeminal neuralgia. **British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery** 2002;40: 244-7.

POSWILLO D. A comparative study of the effects of electrosurgery and cryosurgery in the management of benign oral lesions. **Br J Oral Surg** 1971; 9: 1-7.

POSWILLO D. Evaluation, surveillance and treatment of panoral leukoplakia. **Journal of Maxillofacial Surgery** 1975; 3 (4): 205-11.

POSWILLO D. Applications of cryosurgery in dentistry. **Dent Update**. 1978; 5(1): 27-30, 34-8.

READE PC. Cryosurgery in clinical dental practice. **International Dental Journal**. 1979; 29 (1): 1-11.

SALMASSY DA, POGREL MA. Liquid nitrogen cryosurgery and immediate bone grafting in the management of aggressive primary jaw lesions. **J Oral Maxillofac Surg** 1995; 53(7): 784-90.

SANTOS AMB, SANT'ANA FILHO M. Análise macroscópica do efeito de diferentes protocolos de nitrogênio líquido sobre a mucosa bucal: estudo em ratos. **Rev Fac. Odontol. Porto Alegre** 2002; 43(2): 18-23.

SCHIMDT BL, POGREL MA. Neurosensory changes after liquid nitrogen cryotherapy. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery** 2004;62: 1183-7.

SCORTEGAGNA A, SANT'ANA FILHO M. Análise microscópica de enxerto ósseo autógeno em mandíbula de coelhos submetidos à crioterapia com nitrogênio líquido. **Odonto Ciência** 2004; 19(46): 332-7.

SILVA FM. **Estudo das características histológicas do processo de reparo após aplicação de nitrogênio líquido em tecido ósseo em mandíbulas de coelhos**. Tese de doutoramento. Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2003.

SMIDT R. **Elaboração de modelo experimental para a análise *in vitro* da condutividade de dentes submetidos a variações de temperatura**. Tese de doutoramento. Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2006.

SUNDQVIST G, FIGDOR D, PERSSON S, SJÖGREN U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod** 1998; 85(1): 86-93.

TAL H. Cryosurgical treatment of hemangiomas of the lip. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology** 1992; 73 (6): 650-4.

TAL H, RIFKIN B. Cryosurgical treatment of gingival lichen planus: report of a case. **Journal of American Dental Association** 1986; 113(4): 629-31.

THAI K-E, SINCLAIR R. Cryosurgery of benign skin lesions. **Australasian Journal of Dermatology** 1999; 40: 175-86.

TURJANSKY E, STOLAR E. **Lesiones de piel y mucosas, técnica terapéuticas.** Buenos Aires: Editorial Asociación Médica Argentina, 1995.

TURJANSKY E, STOLAR E. Criocirugía em lesiones de boca. **Revista de la Asociación Médica Argentina** 1992; 105(5): 22-6.

WHITTAKER DK. Electron microscopy of the ice crystals formed during cryosurgery: relationship to duration of freeze. **Cryobiology** 1978; 15: 603-7.

WHITAKKER DK. Ultrastructural changes in the microvasculature following cryosurgery of oral mucosa. **Journal of Periodontal Research** 1975; 10: 148-57.

YEH, C.-J. Simple cryosurgery treatment for oral lesions. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery** 2000; 29: 212-6.

ZACARIAN SA, ADHAM MI. Cryotherapy of cutaneous malignancy. **Cryobiology** 1966; 2(4): 212-8.

ANEXOS

Termo de consentimento

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
DOUTORADO EM CTBMF**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa intitulada “Uso de crioterapia em dentes inoculados com *Enterococcus faecalis*: um estudo *in vitro*”, a ser realizada na Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, no curso de Doutorado em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial. O objetivo é avaliar a crioterapia (uso de baixas temperaturas para promover morte de bactérias) com nitrogênio líquido (substância usada para promover queda de temperatura) no tratamento endodôntico (“tratamento de canal”). O estudo será realizado em laboratório, em dentes extraídos, para verificar se ocorre morte das bactérias após a aplicação do nitrogênio líquido. Todas as informações obtidas irão assegurar proteção de sua imagem e respeitarão valores éticos, morais, culturais e religiosos. Os resultados desta pesquisa poderão ser apresentados em congresso e/ou publicação científica, porém sua identidade será preservada não sendo utilizadas quaisquer imagens ou informações que permitam sua identificação. Se houver qualquer dúvida sobre o estudo, você poderá receber mais esclarecimento com o pesquisador Hedelson Odenir Lecher Borges pelo telefone (51) 3318-7110 ou pelo e-mail hedelson@bol.com.br, e ainda com o professor orientador responsável pela pesquisa, Dr. Manoel Sant’Ana Filho pelo telefone (51) 3320-4109 ou e-mail manoel@ufrgs.br.

Eu,
RG nº....., li a descrição do estudo e, não havendo qualquer dúvida, concordo em participar do mesmo. Confirmando que recebi cópia do termo de esclarecimento para participação na pesquisa. Compreendo que minha participação é voluntária e que posso desistir a qualquer momento, sem prejuízo de meu tratamento. Autorizo a liberação dos dados obtidos para apresentação em eventos científicos e publicações, desde que minha identidade seja preservada.

Porto Alegre,..... de de 2007.

.....
Assinatura do participante

.....
Assinatura do pesquisador

.....
Assinatura do orientador

Carta de aprovação da Comissão Científica e de Ética



*Comissão Científica e de Ética
Faculdade da Odontologia da PUCRS*

Porto Alegre 05 de janeiro de 2007

O Projeto de: Tese

Protocolado sob n°: 0094/06
Intitulado: Uso da crioterapia em dentes inoculados com enterococcus faecalis: um estudo in vitro
Pesquisador Responsável: Prof. Dr. Manoel Sant'Ana Filho
Pesquisadores Associados: Hedelson Odenir Iecher Borges
Nível: Doutorado

Foi **aprovado** pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da PUCRS em 24 de novembro de 2006.

Este projeto deverá ser imediatamente encaminhado ao CEP/PUCRS

Profa. Dra. Marilfa Gerhardt de Oliveira
Presidente da Comissão Científica e de Ética da
Faculdade de Odontologia da PUCRS

Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Ofício 0123/07-CEP

Porto Alegre, 22 de janeiro de 2007.

Senhor(a) Pesquisador(a):

O Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa registro CEP 06/03561, intitulado: **“Uso de crioterapia em dentes inoculados com enterococcus faecalis: um estudo in vitro”**.

Sua investigação está autorizada a partir da presente data.

Relatórios parciais e final da pesquisa devem ser entregues a este CEP.

Atenciosamente,


Prof. Dr. José Roberto Goldim
COORDENADOR DO CEP-PUCRS

Ilmo(a) Sr(a)
Prof Manoel Sant'Ana Filho
N/Universidade

PUCRS

Campus Central
Av. Ipiranga, 6690 – 3º andar – CEP: 90610-000
Fone/Fax: (51) 3320-3345
E-mail: cep@pucrs.br
www.pucrs.br/prppg/cep