

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Odontologia
Programa de Pós-Graduação em Odontologia
Área de Concentração em Clínica Odontológica – Ênfase em Endodontia



Dissertação

Resposta do tecido ósseo a debris de dentina infectados e não infectados

Samantha Rodrigues Xavier

Pelotas, 2019

Samantha Rodrigues Xavier

Resposta do tecido ósseo a debris de dentina infectados e não infectados

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Faculdade de Odontologia, da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Odontologia, Área de Clínica Odontológica ênfase Endodontia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a Fernanda Geraldo Pappen

Co-Orientadora: Prof^a Dr^a Luciane Geanini Pena dos Santos

Pelotas, 2019

Samantha Rodrigues Xavier

Resposta do tecido ósseo a debris de dentina infectados e não infectados

Dissertação apresentada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Clínica Odontológica ênfase Endodontia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 28/02/2019

Banca examinadora:

Prof^a. Dra. Fernanda Geraldo Pappen
Doutora em Endodontia pela Universidade Estadual Paulista – UNESP – Araraquara

Prof^a. Dra. Nádia de Souza Ferreira
Doutora em Endodontia pela Universidade Estadual Paulista - UNESP - São José dos Campos

Prof. Dr. José Antônio Poli de Figueiredo
Doutor em Endodontia pela USP - São Paulo

Prof^a. Dra. Renata Dornelles Morgental (suplente)
Doutora em Endodontia pela Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Prof^a. Dra. Natália Marcumini Pola (suplente)
Doutora em Periodontia pela Universidade Estadual Paulista – Araçatuba

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

X3 Xavier, Samantha Rodrigues

Resposta do tecido ósseo a debris de dentina infectados e não infectados / Samantha Rodrigues Xavier ; Fernanda Geraldo Pappen, orientadora ; Luciane Geanini Pena dos Santos, coorientadora. — Pelotas, 2019.

60 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica - ênfase em Endodontia, Odontologia, Universidade Federal de Pelotas, 2019.

1. Endodontia. 2. Instrumentação. 3. Extrusão de detritos. 4. Inflamação. I. Pappen, Fernanda Geraldo, orient. II. Santos, Luciane Geanini Pena dos, coorient. III. Título.

Black : D24

Elaborada por Fabiano Domingues Malheiro CRB: 10/1955

Agradecimentos

Ao **programa de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia** da Universidade Federal de Pelotas, pela oportunidade de realizar o mestrado em um programa com conceito 6 da CAPES e desfrutar de professores competentes e entusiasmados em dividir os seus conhecimentos.

À **Coordenação do programa**, na pessoa da **Profa. Dra. Tatiana Pereira Cenci** e ao Secretário, **Celaniro Júnior**, pela pronta disponibilidade em ajudar.

À minha chefe **Nuria** do Posto Central do Capão do Leão pela compreensão da necessidade das trocas de turno, ausências e compensações de horário.

À minha orientadora **Fernanda Pappen** que me deu todo o apoio necessário desde a graduação. Agradeço por todos os ensinamentos e pelo exemplo de conduta dentro e fora do meio acadêmico. Pelas oportunidades que me proporcionaste, pelos conhecimentos transmitidos, pela confiança, pela amizade e por todo carinho. Obrigada por me ajudar a qualquer hora ou dia da semana. Obrigada por tudo!

À minha co-orientadora **Luciane Geanini** obrigada pela companhia em todas as idas ao biotério e pelo conhecimento transmitido.

À **Anelize Campello Felix**, do Biotério da UFPEL, que sempre me ajudou nos procedimentos com os animais. Com certeza fizeste as minhas idas ao biotério muito mais agradáveis. Obrigada pela disposição em me ajudar.

À **Ivana** e ao **Bruno** do laboratório de patologia, agradeço pela disponibilidade de ajudar na realização dos meus experimentos.

À professora **Ana Paula** pela disponibilidade e colaboração na execução desse trabalho.

À minha colega **Caroline Fernandes**. Obrigada pela amizade e parceria ao longo desta caminhada.

Ao meu marido **Cristian** que está sempre ao meu lado, me apoiando e incentivando. Obrigado por todo cuidado, amor e lealdade.

À minha mãe, meu pai e ao meu irmão por torcerem pelo meu crescimento pessoal e profissional.

Resumo

Xavier, Samantha Rodrigues **Resposta do tecido ósseo a debris de dentina infectados e não infectados**. 2019. Dissertação de Mestrado em Odontologia – Programa de Pós Graduação em Odontologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019. 59 f.

Apesar do grande número de estudos in vitro demonstrando e quantificando a ocorrência de extrusão apical de debris com diferentes instrumentos, não há evidência científica biológica confirmando a influencia da quantidade e infecção dos debris extruídos na resposta tecidual. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar in vivo a resposta tecidual a diferentes quantidades de debris de dentina infectados e não infectados. A resposta tecidual foi avaliada em 42 ratos Wistar, após 7, 30 e 60 dias ($n = 6$ por período). Para cada animal, três cavidades cirúrgicas foram preparadas no fêmur direito e preenchidas com diferentes quantidades (5mg, 10mg ou 20mg) de debris de dentina infectados ou não infectados. No grupo controle negativo, as cavidades cirúrgicas foram mantidas sem preenchimento. Ao final de cada período experimental, os animais foram eutanasiados aleatoriamente. As amostras foram processadas histologicamente e analisadas usando um microscópio de luz. A presença e a severidade da reação inflamatória, bem como a deposição de tecido mineralizado, foram avaliadas. Os dados foram analisados estatisticamente e os efeitos das variáveis dependentes calculados, usando o software SPSS (versão 20.0, SPSS, Inc., Chicago, USA) usando os testes não paramétricos Kruskal Wallis e Mann-Whitney U com correção de Bonferroni a $p=0,05$. A presença de debris infectados aumentou significativamente os escores para neutrófilos ($P<0.05$), e formação de abscesso ($P<0.05$). Debris não-infectados ocasionaram scores significativamente mais altos de infiltrado linfocítico em comparação ao grupo controle e aos debris infectados. Eosinófilos foram detectados com mais frequência nos grupos contendo debris em comparação ao controle. Com relação às células gigantes e aos macrófagos, não foi detectada diferença entre os grupos ($P>0.05$). Inicialmente, a deposição de tecido mineralizado foi semelhante entre os grupos ($P=1.00$). Os parâmetros histológicos avaliados não foram significativamente influenciados pela quantidade de debris inserida na cavidade ($P>0.05$). Considerando todos os parâmetros avaliados, a resposta inflamatória foi significativamente mais intensa aos 7 dias, em comparação aos períodos de 30 e 60 dias ($P<0,05$). No entanto, a neoformação óssea aumentou significativamente após 30 dias ($P<0,05$). Nenhuma diferença nos parâmetros avaliados foi observada entre 30 e 60 dias ($P=1,00$). É possível concluir que a afirmação de que a quantidade de debris extruída pode afetar negativamente a resposta inflamatória do tecido ósseo não foi validada no presente estudo. Já a presença de debris de dentina infectados pode causar o aumento dos parâmetros inflamatórios agudos, especialmente no período inicial de contato com os tecidos; no entanto, em longo prazo, estes efeitos negativos são atenuados.

Palavras-chave: endodontia; extrusão de detritos; instrumentação; inflamação

Abstract

Xavier, Samantha Rodrigues. **Bone tissue response to infected and non-infected dentin debris**. 2019. Dissertation Master degree in Dentistry. Graduate Program in Dentistry. Federal University of Pelotas, 2019. 59 p.

In spite of the large number of in vitro studies demonstrating and quantifying the occurrence of apical extrusion with different endodontic preparation systems, there is no biological scientific evidence to confirm the influence of the amount and the infection of extruded debris on bone tissue response. Therefore, the objective of this study is to evaluate in vivo the bone tissue response to different amounts of infected and non-infected dentin debris. Bone tissue reactions were evaluated in 42 Wistar rats after 7, 30, and 60 days. For each animal, three surgical cavities were prepared on the right femur and filled with different amounts (5mg, 10mg or 20mg) of infected or non-infected dentin debris. In negative control group, the surgical cavities were kept unfilled. By the end of each experimental period, animals were randomly euthanized. The samples were histologically processed and analyzed using a light microscope. The presence and the severity of inflammatory reaction, as well as hard tissue deposition were evaluated. Data was analyzed statistically and effects of the dependent variables calculated using SPSS statistical software (version 20.0, SPSS, Inc., Chicago, USA) using non-parametric tests Kruskal Wallis and Mann-Whitney U with due Bonferroni correction at $p=0.05$. The presence of infected debris significantly raised the histopathological scores for neutrophils ($P<0.05$), and abscess formation ($P<0.05$). Non-infected debris scored significantly higher for the lymphocyte infiltrate compared to control group, and infected debris ($P<0.05$). Both infected and non-infected debris equally triggered eosinophil cells compared to no-dentine ($P<0.05$). As for giant cells and macrophages no difference was detected among the dentine groups ($P>0.05$). Initially, hard tissue deposition was similar regardless of the presence or the bacteriological status of the debris ($P=1.00$). None of the above histopathological parameters was significantly influenced by the amount of debris ($P>0.05$). For all parameters evaluated, after 7 days of analysis, the inflammatory response was significantly more intense compared to 30 and 60 days ($P<0.05$). However, hard tissue deposition has significantly increased after 30 days ($P<0.05$). No difference was seen between 30 and 60 days of analysis ($P=1.00$) for all histological parameters evaluated. In conclusion, the assumption that the amount of extruded debris may negatively affect the inflammatory response of bone tissue is not validated in the present in vivo animal study. Infected dentine debris may trigger acute inflammatory parameters especially along the first 7 days of contact with the tissue; however, in the long run these negative effects are mitigated.

Key Words: Endodontics, debris extrusion, bone tissue response, infected dentine

Lista de Abreviaturas e Siglas

IL-1	Interleucina-1
IL-6	Interleucina-6
μm	Micrometro
OCN	Osteocalcina
BHI	Brain heart Infusion
Cx	Caixa
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra - acético
L	Litro
mg	Miligramas
ml	Mililitro
mm	Milímetro
NaOCl	Hipoclorito de sódio
Nº	Número
TCLE	Termo consentimento livre e esclarecido
UFPeI	Universidade Federal de Pelotas
Un	Unidade

Sumário

1 Introdução	8
2 Projeto de pesquisa	12
3 Relatório de trabalho de campo	20
4 Artigo	23
5 Considerações finais	47
Referências Bibliográficas	48
Apêndice	54
Anexos	56

1 Introdução

O preparo biomecânico dos canais radiculares, independente dos instrumentos utilizados, resulta na produção de raspas de detritos em decorrência do corte de dentina das paredes dos canais radiculares (CAPAR et al., 2014; TANALP et al., 2006; OZU et al., 2014). Chapman et al. (1968) foram os primeiros autores a constatar a extrusão de material infectante do sistema de canais radiculares durante a instrumentação do canal radicular. Além de raspas de dentina, restos pulpare, micro-organismos e soluções irrigadoras também são constantemente extravasados do forame apical durante a etapa de limpeza e modelagem dos canais radiculares (TANALP et al., 2006; DAGNA et al., 2017).

Podemos relacionar a extrusão de debris a diversos fatores, incluindo a anatomia apical da raiz dentária, a conformação e diâmetro da agulha de irrigação, a técnica e/ ou sistema de irrigação, a profundidade de inserção da agulha durante a irrigação, o diâmetro e conicidade do preparo apical, o design do instrumento, e a técnica de instrumentação (ALTUNDASAR et al., 2011; BÜRKLEIN, BENTEN; SCHÄFER, 2014; BÜRKLEIN, SCHÄFER 2012; GHIVARI et al., 2011; TANALP et al., 2006; TINAZ et al., 2005; SILVA et al., 2016; RIBEIRO et al., 2018; USLU et al., 2018).

Nas últimas décadas, as técnicas e instrumentos utilizados para o preparo biomecânico dos canais radiculares sofreu mudanças drásticas. A introdução das limas de níquel-titânio (NiTi) na Endodontia, como alternativa ao preparo tradicional com instrumentos manuais de aço inoxidável, permitiu o surgimento de sistemas rotatórios mais seguros e eficientes para a realização da limpeza e modelagem de canais radiculares, principalmente canais com curvatura moderada a severa, e canais radiculares atrésicos (WALIA et al., 1988; PETERS, 2004). Posteriormente, o desenvolvimento dos sistemas reciprocantes trouxe outras vantagens ao preparo, como a redução do número de instrumentos utilizados, menor tempo de preparo do canal radicular (NEEKOFAR et al., 2015), otimização da modelagem do canal radicular (BERUTTI et al., 2012) e eliminação da contaminação cruzada associada aos instrumentos clínicos em diferentes pacientes, devido à recomendação de uso único na rotina clínica. Além disso, o uso dos instrumentos de NiTi, na cinemática reciprocante alternada, aumenta a resistência à fadiga do instrumento em comparação ao movimento de rotação contínua (YARED et al., 2008).

Os diversos instrumentos e sistemas desenvolvidos ao longo dos últimos anos cumpriram com o objetivo de diminuir as alterações morfológicas causadas durante o preparo do canal radicular (CIÇEK et al., 2016). No entanto, tais instrumentos têm sido associados a diferentes quantidades de debris extruídos para região apical (GUTMANN et al., 2012; BORGES et al., 2016; USLU et al., 2018). O desenho da secção transversal, a conicidade, a sequência dos instrumentos, a eficácia de corte, a cinemática de emprego, e a técnica de preparo biomecânico utilizada são fatores diretamente relacionados à quantidade de debris extruídos para a região apical (KOÇAK et al., 2013; CAVIEDES et al., 2016; SOWMYA et al., 2013, USLU et al., 2018).

Diversos estudos relacionam o uso de instrumentos na cinemática reciprocante com uma elevada extrusão de debris; superior à observada com o uso da cinemática de rotação contínua (BURKLEIN et al., 2014; BORGES et al., 2016; TOYOLGLU et al., 2017; USLU et al., 2018). Alguns estudos têm sugerido que o movimento reciprocante pode favorecer o acúmulo apical de debris, empurrando-os em direção ao forame apical, enquanto o movimento de rotação contínua aumenta o transporte de raspas de dentina e de debris infectados em direção cervical, facilitando sua remoção durante a irrigação (BÜRKLEIN et al., 2012). Entretanto, tais resultados são controversos, uma vez que alguns estudos apontam para uma maior extrusão apical em canais instrumentados com sistemas rotatórios (TINOCO et al., 2013; DE DEUS et al., 2015; ARLAN et al., 2016; ALVES et al., 2018; BOIJINK et al., 2018). Ainda, de acordo com uma revisão sistemática recente, não há evidências consistentes de que o movimento reciprocante é capaz de produzir maior extrusão de debris para região apical em comparação ao movimento rotatório. (AHN et al., 2016).

Atualmente, é possível observarmos na literatura endodôntica um amplo debate em relação à mensuração dos debris extravasados pelas diferentes técnicas de instrumentação e pelos diversos sistemas disponíveis no mercado (TANALP et al., 2006; DE-DEUS et al., 2010; TASDEMIR et al., 2010; BURKLEIN et al., 2012; KOÇAK et al., 2013,2015; BURKLEIN et al., 2013; CAPAR et al., 2014; SURAKANTI et al., 2014; EHSANI et al., 2016), além da afirmação de que quanto maior a quantidade de debris extravasados, maior a resposta inflamatória. Em média, a quantidade de debris extravasados durante a instrumentação com os diferentes sistemas endodônticos em estudos in vitro, varia de 0,19 a 11,5 mg (TANALP et al.,

2006; DE-DEUS et al., 2010; BURKLEIN et al., 2012; KOÇAK et al., 2013,2015; BURKLEIN et al., 2014; CAPAR et al., 2014; EHSANI et al., 2016; USLU et al., 2018; BOIGNK et al., 2018). Na prática clínica, no entanto, esses resultados podem diferir, com uma tendência à diminuição da quantidade de debris extravasados, uma vez que a presença de tecidos periapicais possivelmente atue como uma barreira natural, exercendo pressão negativa, e prevenindo a extrusão apical.

A alegação que quanto maior o peso dos debris extruídos maior a severidade da resposta inflamatória não ainda foi completamente evidenciada. Podemos afirmar ainda que provavelmente não só a quantidade de debris, mas também o tipo e virulência das bactérias, assim como fatores imunológicos do hospedeiro sejam determinantes no desenvolvimento e manutenção do processo inflamatório periapical em decorrência do extravasamento de detritos (DE DEUS et al., 2015; ELMSALLATI et al., 2009).

Clinicamente, a inflamação e/ou abscesso dos tecidos periapicais é caracterizada por dor de moderada à intensa à mastigação ou percussão (GUTMANN et al., 2009), gerando uma situação indesejada tanto para o profissional quanto para o paciente (SIQUEIRA et al., 2002). De acordo com Siqueira Jr. et al. (2003), durante a instrumentação, espécies bacterianas patogênicas presentes no sistema de canais radiculares podem ser impelidas para os tecidos perirradiculares, quando então, mesmo uma pequena quantidade de debris infectados terá o potencial de causar ou exacerbar a inflamação perirradicular, com consequente *flare-up*, desde que haja a perda de equilíbrio entre as defesas do hospedeiro e a virulência bacteriana. Embora a presença de micro-organismos patogênicos seja um fator causal crítico na ocorrência de *flare-up*, também é aceito que remanescentes pulpares e dentinários contaminados ou não, possam ter potencial para indução de uma reação inflamatória (SELTZER et al., 1968).

Apesar de a literatura reportar o papel da extrusão de debris na ocorrência de dor pós-operatória, inflamação perirradicular e edema, assim como no retardo do reparo periapical (ALTUNDASAR et al., 2011; GERNHARDT et al., 2004; SIQUEIRA et al., 2003), não há evidência científica clara que assinale para a influência da quantidade de debris extruídos no reparo tecidual. Sendo assim, o presente estudo tem como objetivo a avaliação histológica da resposta tecidual frente à inserção de diferentes quantidades de debris infectados e não-infectados em cavidades cirúrgicas preparadas *in vivo*.

2 Projeto de pesquisa

2.1 Introdução

A extrusão apical é uma ocorrência comum durante o preparo químico mecânico, de forma que nenhum instrumento ou técnica é capaz de evitar esse evento (TANALP, GÜNGÖR, 2014). Independentemente do sistema utilizado, a instrumentação dos canais radiculares resulta na produção de raspas de dentina como resultado do corte das paredes dentinárias dos canais radiculares (CAPAR et al., 2014; TANALP et al., 2006; OZU et al., 2014). Além de raspas de dentina, também restos pulpare, micro-organismos e soluções irrigadoras podem extravasar o forame apical durante a etapa de limpeza e modelagem dos canais radiculares (TANALP et al., 2006). A extrusão apical está relacionada ainda a outros vários fatores, incluindo a anatomia apical, o tipo, tamanho da agulha de irrigação, a técnica de irrigação, a profundidade de colocação da agulha, o tamanho e conicidade do preparo apical e a técnica de instrumentação (ALTUNDASAR et al., 2011; BÜRKLEIN, BENTEN; BÜRKLEIN, SCHÄFER 2012; GHIVARI et al., 2011; TANALP et al., 2006; TINAZ et al., 2005; SILVA et al., 2016).

Com o advento das limas de NiTi, houve uma redução na extrusão de debris em comparação à instrumentação com limas manuais (DE-DEUS et al., 2014; TOPÇUOĞLU et al., 2014). No entanto, alguns estudos têm demonstrado que os sistemas de lima única tendem a liberar mais debris que os sistemas de múltiplas limas, assim como o movimento reciprocante tende a forçar apicalmente mais debris e soluções através do forame para os tecidos periapicais que os sistemas rotatórios (CAVIEDES-BUCHELI et al., 2016; AHN et al., 2016; BURKLEIN et al., 2012; SO-YEON et al., 2016). Existem evidências de que o movimento reciprocante pode favorecer o acúmulo apical de debris, empurrando-os em direção ao forame apical, enquanto o movimento de rotação contínua aumenta o transporte de raspas de dentina e de debris infectados em direção cervical, facilitando sua remoção durante a irrigação (BÜRKLEIN; SCHÄFER, 2012). Além do movimento exercido pelo sistema, a secção transversal da lima endodôntica também pode ser considerada uma característica importante na extrusão de debris (CAVIEDES-BUCHEL et al., 2016).

Atualmente, a literatura endodôntica demonstra uma preocupação exacerbada com a quantificação dos debris extravasados pelas diferentes técnicas de instrumentação e pelos diversos sistemas disponíveis no mercado (TANALP et al., 2006; DE-DEUS et al., 2010; TASDEMIR et al., 2010; BURKLEIN et al., 2012; KOÇAK et al., 2013,2015; BURKLEIN et al., 2014; CAPAR et al., 2014; SURAKANTI et al., 2014; EHSANI et al., 2016) e resultados controversos em relação a este tema foram descritos em uma recente revisão sistemática (AHN et al., 2016). O cenário clínico, no entanto, pode diferir destes resultados, uma vez que a presença de tecidos periapicais pode agir como uma barreira natural, prevenindo a extrusão apical.

Apesar do grande número de estudos *in vitro* demonstrando e quantificando a ocorrência de extrusão apical com os diferentes sistemas de preparo endodôntico, não há evidência científica que aponte a influência da quantidade de debris extruídos no reparo tecidual. Sendo assim, o objetivo desse estudo é avaliar histologicamente a resposta tecidual diante a inserção de diferentes quantidades de dentina contaminada e não contaminada em cavidades cirúrgicas preparadas *in vivo*

2.2 Objetivo geral

Avaliar a resposta tecidual diante da inserção de debris infectados e debris não-infectados em cavidades cirúrgicas preparadas em fêmur de ratos.

2.3 Objetivos específicos

2.3.1 Avaliar a resposta inflamatória e a reparação óssea frente a diferentes quantidades de debris inseridas nas cavidades cirúrgicas;

2.3.2 Avaliar a influência da presença bacteriana no processo inflamatório, e no reparo ósseo das cavidades cirúrgicas;

2.3.3 Avaliar a influência do tempo no processo inflamatório, e no reparo ósseo das cavidades cirúrgicas após a inserção de debris infectados e não-infectados.

2.4 Hipótese

A hipótese nula a ser testada é a de que a quantidade de debris, independente da presença de infecção, não influenciará na reação inflamatória tecidual, sendo o organismo capaz de limitar esse evento e reparar o dano tecidual.

A hipótese alternativa é que uma maior quantidade de debris extravasados causará maior reação inflamatória tecidual; e que o dano tecidual será exacerbado na presença de contaminação.

2.5 Metodologia

2.5.1 Tipo de estudo

Estudo laboratorial *in vivo*, utilizando ratos da espécie *Wistar*.

2.5.2 Considerações éticas

Uma vez que os testes serão realizados em animais, previamente ao início do experimento, o projeto de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética em experimentos com animais da Universidade Federal de Pelotas, RS, Brasil.

Além disso, tendo em vista que para simulação dos debris extravasados serão utilizadas raspas de dentina advindas de dentes humanos extraídos, este projeto será também analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas, RS, Brasil.

Para a coleta dos dentes extraídos, o pesquisador responsável será encarregado de manter um biorrepositório* (Resolução CNS Nº 441, DE 12 DE MAIO DE 2011 - Biorrepositório: coleção de material biológico humano, coletado e armazenado ao longo da execução de um projeto de pesquisa específico, conforme regulamento ou normas técnicas, éticas e operacionais pré-definidas, sob responsabilidade institucional e sob gerenciamento do pesquisador, sem fins comerciais). Após o término de vigência deste projeto, os remanescentes dos dentes serão descartados por método apropriado ou doadas ao Banco de Dentes da Faculdade de Odontologia da UFPel.

2.5.3 Cálculo Amostral

O número mínimo de amostras necessárias para identificar diferenças entre os grupos foi identificado usando o teste ANOVA *repeated measures, between factors* da família F de testes do programa G*Power 3.1 para Mac. Em razão da ausência de trabalhos prévios, que correlacionem o volume de detritos dentinários extruídos com a reação inflamatória dos tecidos, foi escolhido um tamanho do efeito médio de 0,5. Outros parâmetros incluídos foram: erro-alpha = 0,05, poder beta = 0,8 e correlação entre os valores repetidos de 0,5. O resultado indicou um total de 6 amostras por grupo e por tempo experimental.

2.5.6 Obtenção dos debris dentinários

Serão coletados 4 dentes molares recém extraídos, com indicação para extração por motivos não relacionados a esta pesquisa. Todos os pacientes/pais serão informados quanto ao propósito do projeto e receberão instruções por meio orais e por escrito no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice A). Após a realização deste estudo, os dentes serão entregues ao Banco de Dentes da Faculdade de Odontologia da UFPel ou devidamente descartados.

Os debris de dentina serão obtidos com o desgaste da porção interna da câmara pulpar de dentes extraídos, com uma broca esférica nº 6, acionada em micromotor de baixa rotação, sob irrigação.

As raspas de dentina serão mantidas em suspensão com BHI e conforme o grupo experimental serão autoclavadas (debris não contaminados), ou infectadas (debris contaminados).

Placa subgengival será coletada de um doador adulto, saudável, e suspensa em caldo *brain-heart infusion* (BHI; Becton Dickinson, Sparks, MD, USA). As raspas de dentina serão incubadas nesta suspensão, em placas de 24 poços sob condições de anaerobiose (AnaeroGen; OXOID, Hampshire, UK) a 37°C, por uma semana.

2.5.7 Procedimentos em animais

Para a realização deste estudo serão necessários 42 ratos da espécie Wistar, com média de idade de 4 meses, pesando em média 300g. Os animais serão originários do Biotério da Universidade Federal de Pelotas.

Previamente ao procedimento cirúrgico, os ratos serão anestesiados através de injeção intraperitoneal com Xilazina 10 mg/kg e Quetamina 25 mg/kg. O fêmur traseiro do lado direito será utilizado para a intervenção. Após tricotomia e desinfecção da área com solução de álcool iodado, será realizada uma incisão na pele dos animais de 5 cm de comprimento utilizando uma lâmina de bisturi nº 11. Em seguida, os tecidos serão divulsionados e o periósteo será exposto. Em cada animal, três cavidades de 2 mm de diâmetro serão preparadas sobre a superfície cortical do fêmur, com aproximadamente 3 mm de distância umas das outras. Estas cavidades serão realizadas com canetas de baixa rotação com pontas diamantadas nº 5, sob irrigação constante com soro fisiológico, seguido de aspiração. A ponta diamantada será posicionada perpendicularmente ao fêmur até atingir a medula óssea. As cavidades cirúrgicas serão preenchidas com debris de dentina, contaminada ou não contaminada, nas seguintes medidas: 5 mg, 10 mg e 20 mg. No grupo controle, a cavidade cirúrgica não será preenchida (Tabela 1). A inserção de detritos seguirá uma ordem previamente estabelecida e será registrada em uma ficha apropriada. A ferida cirúrgica será suturada com fio de nylon 4-0 e cada animal será individualmente identificado pela cauda ou marcação na orelha, e acomodado em ambiente próprio para sua recuperação pós-cirúrgica, sob supervisão de um veterinário. Durante os períodos experimentais, serão mantidos dois ratos por casa, com ciclo de 12 horas dia/noite, temperatura entre 19-23°C, umidade relativa do ar entre 40-70%. A alimentação dos animais, bem como os demais cuidados, seguirá os protocolos regulamentados pelo Biotério da Universidade Federal de Pelotas.

Tabela 1. Distribuição das medidas de debris de dentina e os períodos empregados no experimento.

Grupo	Dentina	Período		
		07 dias	30 dias	90 dias
I	5mg de dentina estéril	6	6	6
II	10mg de dentina estéril	6	6	6
III	20mg de dentina estéril	6	6	6
IV	5mg de dentina contaminada	6	6	6
V	10mg de dentina contaminada	6	6	6
VI	20mg de dentina contaminada	6	6	6
VII	Controle	6	6	6

A eutanásia dos animais será realizada após os períodos de 7, 30 e 90 dias. Para tal, os animais receberão aprofundamento da anestesia com Isoflurano, por via inalatória. Em seguida a perna operada será desarticulada e dissecada para isolar o fêmur. Com um disco de diamante sob baixa rotação o osso será seccionado transversalmente para separação dos blocos contendo as cavidades cirúrgicas. Por um período aproximado de uma semana. As amostras serão montadas em blocos de parafina e processadas para análise histológica. Secções com espessura de 5 mm serão cortadas transversalmente ao longo do eixo do fêmur, montadas em lâminas e coradas com hematoxilina-eosina (H&E). Os cortes serão analisados com um microscópio óptico (RM2235; Leica, São Paulo, Brazil), usando 40,100, 200, e 400x de magnificação. Após, será realizada a análise histológica por um patologista previamente calibrado.

2.5.7 Avaliação histológica

Os eventos celulares inflamatórios serão analisados de acordo com os critérios descritos por Tavares et al., (2013). A ocorrência de infiltrado inflamatório será determinada pela presença de neutrófilos, linfócitos, eosinófilos, macrófagos e células gigantes, classificada como ausente, rara, moderada ou intensa.

Será avaliada ainda a formação de barreira mineralizada, de acordo com os critérios estabelecidos por Assmann et al., (2015), onde a barreira é classificada como: (1) ausente: sem deposição de tecido mineralizado na da abertura da cavidade; (2) parcial: fechamento parcial da cavidade pela deposição de tecido duro; e, (3) completa: fechamento total de cavidade por deposição de tecido.

2.5.8 Análise Estatística

Os dados serão analisados estatisticamente e a diferença entre os grupos calculada utilizando o software estatístico SPSS (versão 20.0, SPSS, Inc., Chicago, USA). Testes não-paramétricos farão a comparação entre os grupos. Múltiplos grupos serão comparados utilizando os testes Kruskal Wallis e Mann-Whitney U com correção de Bonferroni a $p=0.05$.

2.5.9 Orçamento

Material	Quantidade	Valor Unitário	Valor total
Luva	1 cx	R\$ 17,00	R\$ 34,00
Gorro	1 cx	R\$ 7,79	R\$ 7,79
Máscara	1 cx	R\$ 11,99	R\$ 11,99
Xilazina	2 frascos	R\$ 25,00	R\$ 50,00
Quetamina	1 frasco	R\$ 150,00	R\$ 150,00
Gaze	1 cx	R\$ 10,92	R\$ 10,92
Álcool iodado	2 L	R\$ 5,49	R\$ 10,98
Fio de sutura	2 um	R\$ 6,50	R\$ 13,00
Lâmina de bisturi	2 cxs	R\$ 68,33	R\$ 136,66
Protetor de bancada estéril	1 um	R\$ 6,15	R\$ 6,15
Broca carbide	10 um	R\$ 6,77	R\$ 67,70
Isoflurano	3 frascos	R\$ 80,00	R\$ 240,00
Soro fisiológico	1 L	R\$ 2,75	R\$ 2,75
Seringa insulina	10 um	R\$ 20,00	R\$ 20,00
TOTAL			R\$ 761,94

Quadro 1. Orçamento do projeto de responsabilidade dos pesquisadores envolvidos.

2.5.10 Cronograma de atividades

Atividades	Ano/Mês								
	2017				2018				
	Abr-Jun	Jul-Ago	Set	Out-dez	Jan-Maio	Jun-Jul	Ago-Set	Out-Nov	Dez
Revisão da Literatura	X								
Elaboração do Projeto		X							
Qualificação			X						
Submissão ao CEP - UFPel			X						
Obtenção dos animais				X					
Procedimentos cirúrgicos					X				
Processamento histológico					X				
Avaliação histológica						X			
Análise dos dados							X		
Redação da Dissertação								X	
Defesa/Submissão do Artigo									X

Quadro 2. Cronograma das atividades

3 Relatório do Trabalho de campo

Este relatório tem por objetivo apresentar as etapas que envolveram o trabalho de campo do presente estudo, o qual teve como objetivo avaliar a resposta inflamatória e o reparo ósseo frente à inserção de debris de dentina em fêmur de ratos da espécie *Wistar*.

3.1 Comitê de Ética

Após a qualificação e aprovação, o projeto foi encaminhado ao Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas (CEEa/UFPel) e foi aprovado (processo no 23110.004329/2016-73/CEEa 4329) (Anexo A), houve início do experimento. O projeto também foi encaminhado ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Odontologia de Pelotas, em razão da utilização das raspas de dentina de dentes humanos e foi aprovado com número de parecer de 2.737.449 (Anexo B).

3.2 Metodologia

Durante o exame de qualificação do projeto, que ocorreu em Setembro de 2017, foi sugerido pela banca examinadora a alteração dos tempos experimentais, com exclusão do período de 90 dias, uma vez que não se justificaria um tempo experimental tão prolongado frente à resposta metabólica acelerada do modelo animal utilizado. Normalmente a resposta de reparo tecidual ocorre totalmente em no máximo 60 dias. Desta forma, os períodos experimentais passaram a ser 7, 30 e 60 dias.

Na primeira etapa do estudo, foi realizada a intervenção cirúrgica em 36 animais, totalizando 108 cavidades. Nesta fase, os tempos experimentais seguidos eram ainda 7, 30 e 90 dias. Além disso, após a desarticulação das peças ósseas, e processamentos de fixação, descalcificação, inclusão, corte e coloração, houve perda de dezenas de cortes. Na ocasião, seguíamos o protocolo de processamento utilizado na rotina do laboratório de patologia da UFPel. Por algum motivo ainda não identificado, ao longo das trocas de xilol, álcool e lavagens com água, os cortes frequentemente se soltavam das

lâminas. Uma das possíveis causas poderia ter sido insuficiente desidratação. A qualidade final de coloração também não foi considerada satisfatória na época.

Desta forma, os pesquisadores envolvidos no projeto decidiram repetir todo o experimento, alterando os tempos experimentais conforme sugerido pela banca do exame de qualificação, e com algumas modificações no processamento histológico.

Após a obtenção dos animais para realização da segunda etapa do experimento, as intervenções foram realizadas desta vez com mais tranquilidade e padronização de cada passo dos procedimentos. Para o processamento histológico, foi seguido o protocolo utilizado no departamento de Histologia da Faculdade de Odontologia da UNESP-Araçatuba.

Primeiramente as amostras foram fixadas por 48h com formaldeído. Como diferenças neste protocolo, em comparação ao seguido anteriormente, podemos citar a descalcificação mais lenta com EDTA 10% (com trocas de solução, a cada 7 dias por cerca de 30 dias) ao invés de ácido nítrico + uréia (em torno de 7 dias), e o processo de desidratação mais lento e com maior número de trocas álcool etílico. Após foi realizado a lavagem em água corrente por 24 horas.

Na etapa de inclusão, as amostras passaram pelas seguintes etapas:

- a. 1 hora em etanol 70%
- b. 30 minutos em etanol 80%
- c. 30 minutos em etanol 90%
- d. 30 minutos em etanol 95%
- e. 40 minutos etanol 100%
- f. 40 minutos etanol 100%
- g. 40 minutos etanol 100%
- h. 1 hora- etanol-xilol
- i. 30 minutos em xilol 1
- j. 30 minutos em xilol 2
- k. 30 minutos em xilol 3
- l. 1 hora na parafina 1 (Sigma)
- m. 1 hora na parafina 2 (Sigma)
- n. Parafina 3 (Inclusão – Procito)

Os corantes utilizados foram da Merck, o tempo de utilização dos corantes foram 2 minutos de hematoxilina e 2 minutos de eosina.

Na repetição do experimento não houve perda de animais, e a qualidade obtida nos cortes foi indubitavelmente superior à etapa anterior. Durante a execução do projeto, foi estabelecida uma parceria com a UNESP-Araçatuba, de forma que parte das peças foi destinada a coloração para imunohistoquímica. Os reagentes utilizados, a princípio, serão Interleucina-1 (IL-1), Interleucina-6 (IL-6) e osteocalcina (OCN) o que dará origem a um segundo artigo.

Em decorrência do atraso na importação de alguns reagentes, e tendo em vista os prazos estipulados para defesa, apenas o primeiro artigo será apresentado nesta dissertação, o qual contém apenas os resultados referentes à coloração com H&E. (Artigo 1 intitulado On the longitudinal bone tissue responsiveness to infected and non-infected dentin debris. Part 1 Histopathological analysis). Posteriormente, os resultados da imunohistoquímica serão expostos como parte 2 desse artigo.

4 Artigo

International Endodontic Journal

Bone tissue responsiveness to infected and non-infected dentin debris

Samantha Rodrigues Xavier^a, Luciane Geanini Pena dos Santos^a, Ana Paula Neutzling Gomes^a, Anelize Campello Felix^b, Flávio Fernando Demarco^a, Erick Miranda Souza^c, Fernanda Geraldo Pappen^a

^aGraduate Program in Dentistry, Federal University of Pelotas, Pelotas, Brazil

^bCentral Vivarium, Federal University of Pelotas, Pelotas, Brazil

^cDepartment of Endodontics, Federal University of Maranhão, São Luis, Brazil

Running title: Tissue response to dentin debris

Correspondent author:

Fernanda Geraldo Pappen

School of Dentistry, Federal University of Pelotas

Rua Gonçalves Chaves 457, room 507,

Pelotas, RS, Brazil, 96015-560

E-mail: ferpappen@yahoo.com.br

ABSTRACT

Aim: To longitudinally evaluate in vivo the histological bone tissue response of rats to different amounts of infected and non-infected dentine debris.

Methodology: Bone tissue reactions were histologically evaluated in 42 Wistar rats after 7, 30, and 60 days. For each animal, three surgical cavities were prepared on the right femur and filled with different amounts (5mg, 10mg or 20mg) of infected or non-infected dentine debris. In negative control group, the surgical cavities were kept unfilled. By the end of each experimental period, animals were euthanized. The samples were histologically processed and analysed using a light microscope. The presence and the severity of inflammatory reaction, as well as hard tissue deposition were evaluated. Data was analysed statistically and effects of the dependent variables calculated using SPSS statistical software (version 20.0, SPSS, Inc., Chicago, USA) using non-parametric tests Kruskal Wallis and Mann-Whitney U with due Bonferroni corrections at $p=0.05$.

Results: The presence of infected debris significantly raised the histopathological scores for neutrophils ($P<0.05$), and abscess formation ($P<0.05$). Non-infected debris scored significantly higher for the lymphocyte infiltrate compared to control group, and infected debris ($P<0.05$). Both infected and non-infected debris equally triggered eosinophil cells compared to no-dentine ($P<0.05$). As for giant cells and macrophages no difference was detected among the dentine groups ($P>0.05$). Initially, hard tissue deposition was similar regardless of the presence or the bacteriological status of the dentine ($P=1.00$). None of the above histopathological parameters was significantly influenced by the amount of debris ($P>0.05$). For all parameters evaluated, at 7 days of analysis, the inflammatory response was significantly more intense compared to 30 and 60 days ($P<0.05$). However, hard tissue deposition has significantly increased after 30 days ($P<0.05$). No difference was seen between 30 and 60 days of analysis ($P=1.00$) for all histological parameters evaluated.

Conclusion: The assumption that the amount of extruded debris may negatively affect the inflammatory response of bone tissue is not validated in the present in vivo animal study. Infected dentine may trigger acute inflammatory parameters especially along the first 7 days of contact with the tissue; however, in the long run, these negative effects are mitigated.

Key Words: Endodontics, debris extrusion, bone tissue response, infected dentine

Introduction

The root canal chemomechanical preparation is taken as one of the paramount steps for successful endodontic treatment (Ozsu *et al.* 2014). However, during instrumentation, an undesired side effect is likely to happen, as dentine chips, pulp tissue fragments, necrotic tissue, microorganisms and irrigants may be transported apically and extruded into the periradicular tissues (Seltzer *et al.* 1985, Siqueira *et al.* 2002). Because it is not an uncommon event (Tanalp & Gungor 2013), apical extrusion following root canal preparation is under constant spotlight by endodontic community, as it may trigger inflammatory reactions in the periapical region and subsequent postoperative pain, swelling, (Siqueira *et al.* 2003, Parirokh *et al.* 2012) and flare-up, possibly delaying or impairing the healing process (Siqueira *et al.* 2003).

In this sense, root canal instrumentation systems have been routinely scrutinized and ranked by several *in vitro* researches according to the amount of extruded debris along root canal preparation (Tinaz *et al.* 2005, Costa *et al.* 2017, Labbaf *et al.* 2017, Western *et al.* 2017). There is a relatively large body of evidence indicating that different endodontic instrumentations systems, notably the mechanized ones, may induce distinct quantities of apically extruded debris (Gutmann *et al.* 2012). These results are usually associated to the design, size and taper of the instrument, as well as its kinematics, finally leading to the conclusion that the amount of apically extruded debris is directly related to the instrumentation system and technique chosen for root canal preparation (Koçak *et al.* 2013, Caviades *et al.* 2016, Sowmya *et al.* 2013), which, at last, shapes the knowledge background that reinforces the concern towards debris extrusion during root canal treatment.

Although of concern, the in vitro results on debris extrusion during root canal treatment are conflicting (Pedrinha *et al.* 2018, Ahn *et al.* 2016). Reciprocating instruments, for instance, in some studies, may cause more debris extrusion than files used under continuous rotation (Burklein *et al.* 2014, Borges *et al.* 2016, Toyolglu *et al.* 2017, Uslu *et al.* 2018), while opposite results are also reported (Tinoco *et al.* 2013, De-Deus *et al.* 2015, Arlan *et al.* 2016). However, the in vitro phenomenon of apical extrusion shall not be taken isolated, since clinically, the presence of periapical tissues may serve as a natural barrier providing a physical back pressure, limiting the apical extrusion of debris and irrigants (Bonaccorso *et al.* 2009), possibly contributing to reduce its overall in vivo impact. Furthermore, the claim that greater extruded debris weight would contribute to increase the severity of the inflammatory response is not well rationalized, as not only the debris amount, but also the virulence and bacteriological status and the host tissue resistance may be of importance (De-Deus *et al.* 2015, Elmsallati *et al.* 2009).

In spite of the large number of in vitro studies demonstrating and quantifying the occurrence of apical extrusion with different endodontic preparation systems, there is no biological evidence to support the rational that the amount and the bacteriological status of dentinal debris influence the bone tissue response. Therefore, the objective of this study is to longitudinally evaluate, in vivo, the bone tissue response of rats to different amounts of infected and non-infected dentine debris. The core hypotheses tested are that the presence of infected dentine and its amount can trigger more severe inflammatory reactions and impair the healing rate of rats bone tissue.

Materials and Methods

The Research Ethics Committee for Animal Use of the Federal University of Pelotas, Brazil approved this study (Protocol nº 23110.004329/2016-73). All procedures were carried out in accordance with institutional guidelines for animal care and use. Wistar rats (*Rattus norvegicus*; age, 4 months; weight, ~300 g) were used. Bone tissue reactions to infected and non-infected dentine debris were evaluated in 42 rats after three experimental periods (7, 30, and 60 days; n = 6 per period). Three cavities were prepared in each animal, in a total of 126 cavities.

Surgical cavities were randomly allocated to different experimental and control groups. The animals' tails were marked for individual identification. The rats were housed in plastic cages (two per cage) placed in ventilated racks (Alesco, Monte Mor, SP, Brazil) at 22°C with a 12 h light/dark cycle (lights on between 7am to 7pm). The animals were provided with a standard diet of rat chow (Nuvilab, Colombo, PR, Brazil) and filtered water *ad libitum* during the experiment.

Sample calculation

The minimum number of samples needed to identify differences between groups was determined using the G * Power 3.1 program for Mac (ANOVA test for repeated measures, between factors from the F family of tests). Due to the absence of previous works, that correlate the volume of extruded dentine with the inflammatory tissue reaction, an average effect size of 0.5 was chosen. Other parameters included were: alpha-error = 0.05, beta-power = 0.8 and

correlation between the repeated values of 0.5. The result indicated a total of 6 samples per group and per experimental time.

Production of infected and non-infected dentinal debris

Four freshly removed molar teeth were collected, after extraction for reasons not related to this research. Teeth were kept in 0.5% sodium hypochlorite to remove soft tissue, rinsed in distilled water and autoclaved. The crowns of the teeth were removed with a diamond saw and the dentine debris were obtained by wearing the inner portion of the pulp chamber with a spherical drill no. 5, driven in a low rotation handpiece under irrigation. Dentine debris were then, immediately suspended in brain-heart infusion broth (BHI; Becton Dickinson, Sparks, MD, USA).

With the aim to keep dentine debris in humidity, in the non-infected debris group, they were kept suspended in sterile BHI (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA), for 7 days time before being used in the used. For the infected debris group, subgingival plaque were collected from an adult, healthy donor and suspended in BHI. Further, the dentine debris were incubated in this suspension using 24 well plates under Anaerobic conditions (AnaeroGen; OXOID, Hampshire, UK) at 37 ° C for one week.

Before animal procedures, the excess of BHI medium were removed using a paper filter, and the dentine debris were weighed in a precision scale.

Animal procedures

This methodology was adapted from Assmann *et al.* (2015). Briefly, animals were anesthetized by intraperitoneal injection with 0.008 mL/100 g

ketamine (Virbac do Brasil, São Paulo, SP, Brazil) and 0.004 mL/100 g 2% xylazine hydrochloride (Virbac do Brasil), and 0,03 mL/100g tramadol hydrochloride by subcutaneous injection. The right femur was used for intervention. Trichotomy was performed and the area was disinfected with alcohol iodine solution. A 5 cm long incision was made on the skin, tissues were separated by layers, and the periosteum was incised with a Surgical Scalpel Blade #15. Three cavities with 2 mm in diameter were prepared on the cortical surface of the femur, at a 3 mm distance from each other, by means of a low-speed handpiece and a #5 round steel bur (KG Sorensen, São Paulo, SP, Brazil) under constant irrigation with saline solution and aspiration.

The bur was positioned perpendicularly to the femur and used until reaching the bone marrow. The surgical cavities were randomly designated to experimental groups, which were filled with different amounts (5mg, 10mg or 20mg) of either infected or non-infected dentine debris. In the control group, the surgical cavities were not filled (Figure 1).

Finally the wound was sutured in layers (Nylon 4-0 Procure, Labor import, Osasco, SP, Brazil). After the experimental procedures, the animals were placed in cages until their recovery from anesthesia. Two animals were kept per house, with cycle of 12 hours day/night, temperature between 19-23°C, relative air humidity between 40-70%. To aid recovery, paracetamol (0.06 mg g⁻¹day⁻¹) was added to their drinking water for 72 h.

Euthanasia

The animals were euthanized 7, 30 or 60 days after intervention (n = 6 per group at each time point), by means of inhalation of isoflurane in a closed

chamber until loss of vital signs and consequent cardiorespiratory arrest. The operated leg was disarticulated and dissected to isolate the femur. Then, with a low-speed diamond disc (KG Sorensen), the bone was transversally sectioned to separate each region with the surgical cavities. Each fragment was individually stored in a fixative solution consisting of 10% neutral-buffered formalin for 24h.

The specimens were decalcified in a 10% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) solution for 4 weeks and then dehydrated, clarified, and embedded in paraffin. Sections with 5- μ m thickness were cut transversely to the long axis of the femur, mounted on slides, and stained with hematoxylin-eosin.

Histological evaluation

Slices were analysed with a light microscope (DM3000 LED; Leica, São Paulo, Brazil), using 40, 100, 200, and 400x magnification. The repair process was analysed according to histological parameters. The presence of inflammatory response and the hard tissue deposition was evaluated by a previously calibrated experienced pathologist who was blinded to sample group assignment performed histological evaluation of the H&E-stained sections.

The cellular inflammatory component was determined by the presence of neutrophils, lymphocytes, eosinophils, macrophages, and giant cells. These cellular events were then classified according to the following scale, described by Tavares *et al.* (2013): (0) Absent: Inflammation was either absent or within blood vessels; (1) Mild: Cells were present although sparse or in reduced clusters; (2) Moderate: Cells were present, but not dominating the microscopic field; (3) Intense: Cells were present in the form of an infiltrate within the

surgical cavity. The abscess formation was also assessed and recorded as (0) absent or (1) present.

Hard tissue deposition was modified from the criteria used by Assmann et al. (2015), as follows: (0) Absent: no hard tissue deposition on the cavity region; (1) Formation of immature bone tissue, beginning the process of closure of the experimental defect; (2) Partial: partial close of cavity by hard tissue deposition; (3) Complete: total close of cavity by hard tissue deposition.

In order to test the intra-examiner variability, Kappa coefficient was obtained using a sample of 15 sections. The intra-examiner weighted Kappa was calculated separately for the presence of inflammatory cells ($k = 0.89$, $P < .001$), abscess formation ($k = 1.00$, $P < .001$), and hard tissue deposition ($k = 1.00$, $P < .001$).

Statistical Analysis

Categorical data was statistically scrutinized by using IBM SPSS statistical software (version 24.0, SPSS, Inc., Chicago, USA). Histopathological events were considered as the dependent variables, while debris (infected, non-infected and no-dentine), amount of debris (0mg, 5mg, 10mg and 20mg) and time of evaluation (7 days, 30 days and 60 days) were considered as the independent variables. The effect of each independent variable over the dependent variables was studied individually by using a non-parametric test, Kruskal Wallis with the due Bonferroni corrections. Pair-wise comparisons were also studied by means of a Mann-Whitney U test also with Bonferroni correction. All significances were accepted at $P=0.05$. Box-plot graphs were

constructed following interaction of the independent variables displaying significance at individual evaluations.

Results

The median scores obtained for the evaluated histopathological events, in each time interval, are presented in Table 1. Examples of histopathological parameters assessed within the different groups and experimental periods are shown in Figure 2.

Regarding the presence and the bacteriological status of the debris inoculated in the surgical cavities, Kruskal Wallis demonstrated a significant difference among the groups for neutrophils ($P=0.003$), lymphocytes ($P=0.006$), eosinophils ($P=0.048$) and abscess formation ($P=0.003$). Further investigation with Mann-Whitney U revealed that, compared to no debris and non-infected debris, the presence of infected debris scored significantly higher for neutrophil infiltrate ($P= 0.005$, 0.015 , respectively), and abscess formation ($P= 0.006$, 0.01 , respectively). Non-infected debris significantly raised the severity of lymphocyte infiltrate compared to no-debris and infected debris ($P=0.014$, 0.012 , respectively). Both infected and non-infected debris equally triggered eosinophil cells compared to no-dentine ($P=0.021$ for both). As for giant cells and macrophages, no difference was detected among the dentine debris groups ($P=0.087$ and $P=0.174$, respectively). Hard tissue deposition was similar regardless of the presence or the bacteriological status of debris ($P=1.00$).

As for the effect of the amount of dentine debris over the histopathological parameters, Kruskal-Wallis revealed that none of them was significantly influenced by this variable ($P=0.249$ for neutrophil infiltrate,

P=0.204 for lymphocyte infiltrate, P=0.198 for giant cells, P=0.12 for eosinophils and P=0.381 for macrophages, P=0.339 for abscess formation, P=1.00 for hard tissue deposition).

Time of evaluation was also seen to significantly influence the dependent variables under test (Kruskal-Wallis, P=0.000 for all parameters). For all histological parameters evaluated, after 7 days of analysis, a significantly higher inflammatory responsiveness was noticed compared to 30 and 60 days (Mann-Whitney U, P=0.000 for all parameters and comparisons), except for hard tissue deposition, which has significantly scored higher after 30 days (Mann-Whitney U, P=0.000). No difference was seen between 30 and 60 days of analysis (Mann-Whitney U, P=1.00) for all histological parameters evaluated.

Because significance was detected for both the time of evaluation and the presence and the bacteriological status of the dentine, box-plot graphs of the interaction of these two variables were constructed confirming the influence of the debris presence and status mostly at 7 days of analysis (Figure 3).

Discussion

Endodontic scientific community have been systematically assuming a hazard influence of debris extrusion to apical tissue healing (Boijink *et al.* 2018, Uslo *et al.* 2018), even though, clinically, the determination of the frequency and the specific amount of debris or bacteria extrusion occurred during root canal preparation is yet to be determined, as well as the tissue response to different amounts of dentine debris, and the role of infected debris in this process.

Numerous laboratory studies have been conducted to determine which intra-canal procedures result in more or less extrusion of hard tissue debris

(Topcuoglu *et al.* 2016, Burklein *et al.* 2012, 2014, Uslu *et al.* 2018) or bacteria (Aksel *et al.* 2017, Teixeira *et al.* 2015, Kustarci *et al.* 2008, Tinoco *et al.* 2013) through the apical foramen, based on the assumption of debris apical extrusion being capable to trigger a more severe inflammatory reaction that may impair the apical healing process. As opposite to that, the most relevant finding of the present study evidences that the amount of dentine debris (infected or not) do not influence the inflammatory process of bone tissue. Thus, associating the amount of extruded debris with the bone inflammatory level may be misleading. At a first glance, this may seem as a controversial and peculiar finding once all body of evidence accumulated in endodontics have used this very trivial and biologically plausible rationale to justify the studies attempting to rank root canal preparation systems and techniques according to the amount of extruded apical debris. However, the present result can be taken more conceptually considering the systematic lack of experimental studies specifically designed to evaluate the causality or not between those variables.

In a clinical situation, it is expected that the debris extruded apically stay in intimate contact with periodontal soft and hard tissues. Then, to better mimic the clinical condition, the present study had followed the methodology previously described by Assmann *et al.* (2015), in which different sealers were put in direct contact with bone tissue, using Wistar rats femurs. The bone tissue reaction to endodontic sealers is frequently described in the literature (Sousa *et al.* 2006, Cintra *et al.* 2006, Moretton *et al.* 2000), and the use of this model to simulate the apical extrusion of debris in contact with bone tissues seems to be a suitable experimental model in the present framework. The effect of endodontic materials or dentinal debris on bone has unquestionable clinical

relevance, since a primary goal of endodontics is the maintenance or regeneration of the bone tissue supporting teeth in a healthy state.

Studies carried out in rats, regarding the bone tissue reaction, usually are performed with a maximum experimental period of thirty, sixty, or ninety days (Cintra *et al.* 2006, Rahimi *et al.* 2012, Assmann *et al.* 2015, Quintana *et al.* 2018). The present study lasted 60 days, which is consistent with the majority of studies. The experimental periods chosen demonstrated to be adequate to validate the differences between groups, which occurred at 7 days. Moreover, there was no need to longer periods of follow up, since at 60 days all the samples showed absence of inflammation and complete hard tissue barrier deposition.

The choice regarding the amount of debris to be included in surgical cavities (5mg, 10mg and 20mg) was based on previous *in vitro* studies, which described that the average amount of debris extruded during the root canal therapy ranges from 0.19 to 11.5 mg (Tanalp *et al.* 2006, De-Deus *et al.* 2010, Tasdemir *et al.* 2010, Burklein *et al.* 2012, Koçak *et al.* 2013,2015, Burklein *et al.* 2014, Capar *et al.* 2014, Surakanti *et al.* 2014, Ehsani *et al.* 2016, Uslu *et al.* 2018, Boijink *et al.* 2018). However, if instead of the average, we consider the maximum amount of debris reported, it is possible to find reports of up to 30.8mg of debris extruded apically (Uslu *et al.* 2018). Nevertheless, it is important to highlight that periapical tissues may serve as a natural barrier providing a physical back pressure, thereby limiting the apical extrusion of debris and irrigants (Bonaccorso *et al.* 2009).

Similarly to the weight of debris extruded (quantitative factor), it is commonly assumed a direct correlation between the virulence of the bacteria

and the severity of the periapical inflammation (qualitative factor) (Kalra *et al.* 2017). In fact, bacteria may extrude along with debris through the apical foramen (Siqueira *et al.* 2003, Naidorf *et al.* 1985). However, the present study was not focused on classifying the intensity of the inflammatory reaction based on the virulence of different microorganisms, but rather to observe whether the presence of anaerobically infected debris would negatively influence the tissue reaction. At 7 days, independently of the amount, infected debris induced intense acute inflammatory infiltrate and abscess formation in every evaluated samples, with high scores for neutrophils, and as a consequence being more irritating to bone tissue than non-infected debris. These findings are in accordance with the literature, which described that pathogenic bacterial content of debris are associated with the acute inflammatory reaction, via higher neuropeptide expression in the periradicular tissues (Caviedes-Bucheli *et al.* 2010, 2013, 2016).

Even though infected debris had increased the frequency and the severity of inflammatory infiltrate and abscess formation at initial period of evaluation, at 30 and 60 days, all the groups were similar regarding these cellular events. Moreover, the hard tissue barrier was complete in all samples from experimental and control groups, at 60 days. These findings indicate that progressively, after a short-term the initial negative impact is mitigated and the tissue healing is invariably reached contact with infected debris. The longitudinal character of the present histological evaluation is of interest, since it helps to increase understanding the overall role of the extruded debris. It highlights the fact that, even though infected debris extrusion may be initially pro-inflammatory, after a short-term the initial negative impact is mitigated and

the tissue healing is invariably reached. As previously discussed, the overall role of the presence of dentine debris in the bone tissue might be overestimated by the scientific community and, as such, the generally accepted biological rationale used to rank instruments and instrumentation techniques based on the occurrence of debris extrusion should be reconsidered.

According to our findings, it is reasonable to say that the endodontic scientific community has been actually assigning an unproven role for the phenomenon of the studies on apical extrusion of debris. In other words, the core rationale used by in vitro apical extrusion studies has been accepted based on a non-experimentally tested idea. Actually, this is a very common behavior among endodontic scientific community, to assume in vitro surrogates as being of in vivo relevance based on simply logical or biological plausibility. Speculative biological plausibilities have been largely employed as rationale to formulate working hypothesis based on which several in vitro studies are conducted. However, it is fair to say that a given working hypothesis without experimentation is an unsupported speculation; thus, as far as the real role of the extruded debris is under the spot, there is a clear need of gathering in vivo experimental evidence and, in this sense; the current study fits very well into this background. At last, the present result emphasizes the necessity to question hypothesis or assumptions prior to their being considered as a real dogma or universal beliefs.

Conclusion

The generally accepted assumption that the amount of extruded dentine may negatively affect the inflammatory response of bone tissue is not validated

in the present in vivo animal study. Infected dentine may trigger some inflammatory parameters, most specifically, neutrophils and abscess, especially along the first 7 days of contact with the tissue; however, in the long run these negative effects are diminished and complete healing is achieved.

Acknowledgement

The authors deny any conflicts of interest.

References

Ahn SY, Kim HC, Kim E (2016) Kinematic effects of nickel-titanium instruments with reciprocating or continuous rotation motion: A systematic review of in vitro studies. *Journal of Endodontics* **42**, 1009–17.

Aksel H, Kuçukkaya Eren S, Çakar A, Serper A, Ozkuyumcu C, Azim AA (2017) Effect of Instrumentation Techniques and Preparation Taper on Apical Extrusion of Bacteria. *Journal of Endodontics* **43**, 1008–10.

Arslan H, Doganay E, Alsancak M, Capar ID, Karatas E, Gunduz HA (2016) Comparison of apically extruded debris after root canal instrumentation using Reciproc instruments with various kinematics. *International Endodontic Journal* **49**, 307–10.

Assmann E, Böttcher DE, Hoppe CB, Grecca FS, Kopper PMP (2015) Evaluation of bone tissue response to a sealer containing mineral trioxide aggregate. *Journal of Endodontics* **4**, 62–66.

Boijink D, Costa DD, Hoppe CB, Kopper PMP, Grecca FS (2018) Apically Extruded Debris in Curved Root Canals Using the WaveOne Gold Reciprocating and Twisted File Adaptive Systems. *Journal of Endodontics* **44**, 1289–92.

Bonaccorso A, Cantatore G, Condorelli GG, Schafer E, Tripi TR (2009) Shaping ability of four nickel-titanium rotary instruments in simulated S-shaped canals. *Journal of Endodontics* **35**, 883–6.

Borges AH, Pereira TM, Porto AN, De Araújo Estrela CR, Miranda Pedro FL, Aranha AM, Guedes OA (2016) The influence of cervical preflaring on the amount of apically extruded debris after root canal preparation using different instrumentation systems. *Journal of Endodontics* **42**, 465–9.

Burklein S, Benten S, Schafer E (2014) Quantitative evaluation of apically extruded debris with different single-file systems: Reciproc, F360 and OneShape versus Mtwo. *International Endodontic Journal* **47**, 405–9.

Burklein S, Schafer E (2012) Apically extruded debris with reciprocating single-file and full-sequence rotary instrumentation systems. *Journal of Endodontics* **38**, 850–2.

Capar ID, Arslan H, Akcay M, Ertas H (2014) An in vitro comparison of apically extruded debris and instrumentation times with ProTaper universal, ProTaper next, twisted file adaptive, and HyFlex instruments. *Journal of Endodontics* **40**, 1638–41.

Caviedes- Bucheli J, Castellanos, F, Vasquez, N, Ulate N, Munoz HR (2016) The influence of two reciprocating single-file and two Rotary- file systems on the

apical extrusion of debris and its biological relationship with symptomatic apical periodontitis. A systematic review and meta- analysis. *International Endodontic Journal* **49**, 255-70.

Caviedes-Bucheli J, Azuero-Holguin MM, Gutierrez-Sanchez L *et al.* (2010) The effect of three different rotary instrumentation systems on Substance P and Calcitonin gene-related peptide expression in human periodontal ligament. *Journal of Endodontics* **36**, 1938–42.

Caviedes-Bucheli J, Moreno JO, Carreño CP *et al.* (2013) The effect of single-file reciprocating systems on Substance P and Calcitonin gene-related peptide expression in human periodontal ligament. *International Endodontic Journal* **46**, 419–26.

Cintra LT, de Moraes IG, Estrada BP, Gomes-Filho JE, Bramante CM, Garcia RB, Bernardinelli N (2006) Evaluation of the tissue response to MTA and MBPC: Microscopic analysis of implants in alveolar bone of rats. *Journal of Endodontics* **32**, 556–9.

Costa EL, Sponchiado Júnior EC, Garcia LFR, Marques AAF (2017) Effect of large instrument use on shaping ability and debris extrusion of rotary and reciprocating systems. *Journal of Investigative and Clinical Dentistry* **9**, 1-8.

De-Deus G, Brandao MC, Barino B, Di Giorgi K, Fidel RAS, Luna AS (2010) Assessment of apically extruded debris produced by the single-file ProTaper F2 technique under reciprocating movement. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics* **110**, 390–4.

De-Deus G, Neves A, Silva EJ *et al.* (2015) Apically extruded dentin debris by reciprocating single-file and multi-file rotary system. *Clinical Oral Investigations* **19**, 357–61.

Ehsani M, Farhang R, Harandi A, Tavanafar S, Raoof M.; Galledar S (2016) Comparison of Apical Extrusion of Debris by using single-file, full sequence rotary and Reciprocating Systems *Journal of Dentistry of Tehran* **13**, 394-9.

Elmsallati EA, Wadachi R, Suda H (2009) Extrusion of debris after use of rotary nickel-titanium files with different pitch: a pilot study. *Australian Endodontic Journal* **35**, 65–9.

Gutmann JL, Gao Y (2012) Alteration in the inherent metal- lic and surface properties of nickel-titanium root canal instruments to enhance performance, durability and safety: a focused review. *International Endodontic Journal* **45**, 113–28.

Kalra P, Rao A, Suman E, Shenoy R, Suprabha BS (2017) Evaluation of conventional, protaper hand and protaper rotary instrumentation system for

apical extrusion of debris, irrigants and bacteria- An *in vitro* randomized trial. *Journal of Clinical and Experimental Dentistry* **9**, 254-8.

Koçak MM, Çiçek E, Koçak S, Sağlam BC, Yılmaz N (2015) Apical extrusion of debris using ProTaper Universal and ProTaper Next rotary systems. *International Endodontic Journal* **48**, 283–6.

Koçak S, Koçak MM, Sağlam BC, Türker SA, Sağsen B, Er O (2013) Apical extrusion of debris using self-adjusting file, reciprocating single-file, and 2 rotary instrumentation systems. *Journal of Endodontics* **39**, 1278–80.

Kustarci A, Akpınar KE, Sumer Z, Er K, Bek, B (2008) Apical extrusion of intracanal bacteria following use of various instrumentation techniques. *International Endodontic Journal* **41**, 1066–71.

Labbaf H, Moghadam KN, Shahab S, Bassir MM, Fahimi MA (2017) An In vitro Comparison of Apically Extruded Debris Using Reciproc, ProTaper Universal, Neolix and Hyflex in Curved Canals. *Iranian Endodontic Journal* **12**, 307-11.

Moretton TR, Brown CE Jr, Legan JJ, Kafrawy AH (2000) Tissue reactions after subcutaneous and intraosseous implantation of mineral trioxide aggregate and ethoxybenzoic acid cement. *Journal of Biomedical Materials Research* **52**, 528–33.

Naidorf IJ (1985) Endodontic Flare-ups: bacteriological and immunological mechanisms. *Journal of Endodontics* **11**, 462-4.

Ozsu D, Karatas E, Arlan H, Topcu MC (2014) Quantative evalution of apically extruded debris during root canal instrumentation with ProTaper Universal, Protaper Next, WaveOne, and self-adjusting file systems. *European Journal of Dentistry* **8**, 504-8.

Parirokh M, Jalali S, Haghdooost AA, Abbott PV (2012) Comparison of the effect of various irrigants on apically extruded debris after root canal preparation. *Journal of Endodontics* **38**, 196–9.

Pedrinha VF, Brandão JMS, Pessoa OF, Rodrigues PA (2018) Influence of File Motion on Shaping, Apical Debris Extrusion and Dentinal Defects: A Critical Review. *The Open Dentistry Journal* **12**, 189-201.

Quintana RM, Jardine AP, Grechi TR *et al.* (2018) Bone tissue reaction, setting time, solubility, and pH of root repair materials. *Clinical Oral Investigations*, 1-8.

Rahimi S, Mokhtari H, Shahi S *et al.* (2012) Osseous reaction to implantation of two endodontic cements: Mineral trioxide aggregate (MTA) and calcium enriched mixture (CEM). *Medicina Oral Patologia Oral y Cirugia Bucal* **17**, 907-11.

Seltzer S, Naidorf IJ (1985) Flare-ups in endodontics: etiological factors. *Journal of Endodontics* **11**, 472-8.

Siqueira JF (2003) Microbial causes of endodontic flare-ups. *International Endodontic Journal* **36**, 453-63.

Siqueira JF, Roças IN, Favieri A, Machado AG, Gahyva SM, Oliveira JCM (2002) Incidence of postoperative pain after intracanal procedures based on an antimicrobial strategy. *Journal of Endodontics* **28**, 457-60.

Sousa CJ, Montes CR, Pascon EA, Loyola AM, Versiani, MA (2006) Comparison of the intraosseous biocompatibility of AH Plus, EndoREZ, and Epiphany root canal sealers. *Journal of Endodontics* **32**, 656-62.

Sowmya HK, Subhash TS, Goel BR, Nandini TN, Bhandi SH (2014) Quantitative assessment of apical debris extrusion and intracanal debris in the apical third, using hand instrumentation and three rotary instrumentation systems. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* **8**, 206-10.

Surakanti JR, Venkata RC, Vemisetty H, Dandolu RK, Jaya NK, Thota S (2014) Comparative evaluation of apically extruded debris during root canal preparation using ProTaperTM, HyflexTM and WaveoneTM rotary systems. *Journal of Conservative Dentistry* **17**, 129-32.

Tanalp J, Güngör T (2014) Apical extrusion of debris: A literature review of an inherent occurrence during root canal treatment. *International Endodontic Journal* **47**, 211-21.

Tanalp J, Kaptan F, Sert S, Kayahan B, Bayirli G (2006) Quantitative evaluation of the amount of apically extruded debris using 3 different rotary instrumentation systems. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics* **101**, 250-7.

Tasdemir T, Er K, Çelik D, Aydemir H (2010) An in vitro comparison of apically extruded debris using three rotary nickel- titanium instruments. *Journal of Dental Science* **5**, 121-5.

Tavares CO, Bottcher DE, Assmann E *et al.* (2013) Tissue reactions to a new mineral trioxide aggregate-containing endodontic sealer. *Journal of Endodontics* **39**, 653-7.

Teixeira JM, Cunha FM, Jesus RO, Silva EJNL, Fidel SR, Sassone LM (2015) Influence of working length and apical preparation size on apical bacterial extrusion during reciprocating instrumentation. *International Endodontic Journal* **48**, 648-53.

Tinaz AC, Alacam T, Uzun O, Maden M, Kayaoglu G (2005) The effect of disruption of apical constriction on periapical extrusion. *Journal of Endodontics* **31**, 533–5.

Tinoco JM, De-Deus G, Tinoco EMB, Saavedra F, Fidel RAS, Sassone LM (2013) Apical extrusion of bacteria when using reciprocating single-file and rotary multifile instrumentation systems. *International Endodontic Journal* **47**, 560–6.

Topcuoglu HS, Zan R, Akpek F *et al.* (2016) Apically extruded debris during root canal preparation using Vortex Blue, K3XF, ProTaper Next and Reciproc instruments. *International Endodontic Journal* **49**, 1183–7.

Toyoglu M, Altunbas D (2017) Influence of different kinematics on apical extrusion of irrigant and debris during canal preparation using K3XF instruments. *Journal of Endodontics* **43**, 1565–8.

Uslu G, Ozyurek T, Yilmaz K, Gundogar M, Plotino G (2018) Apically Extruded Debris during Root Canal Instrumentation with Reciproc Blue, HyFlex EDM, and XP-endo Shaper Nickel-titanium Files. *Journal of Endodontics* **44**, 856–59.

Western JS, Dicksit DD (2017) Apical extrusion of debris in four different endodontic instrumentation systems: A meta-analysis. *Journal of Conservative Dentistry* **20**, 30–36.

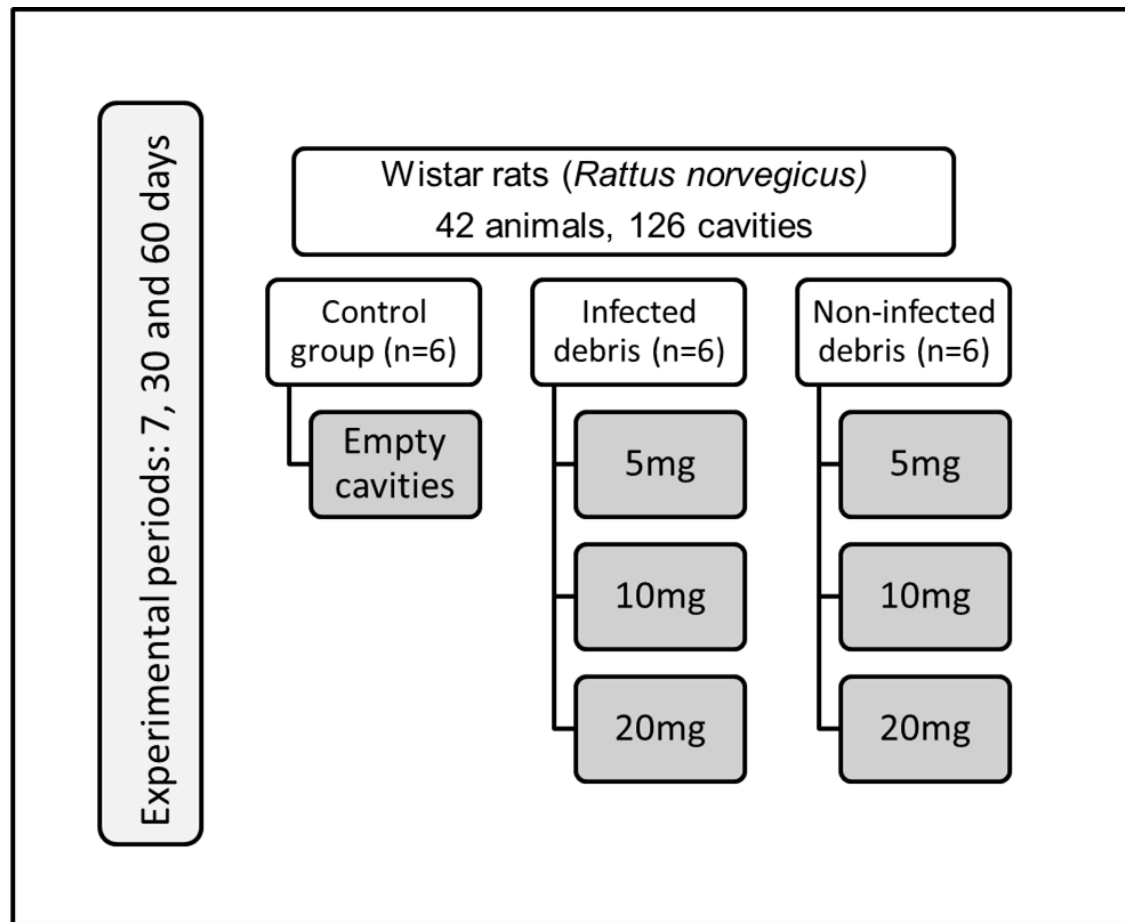


Figure 1 Experimental groups and negative control group included in the study.

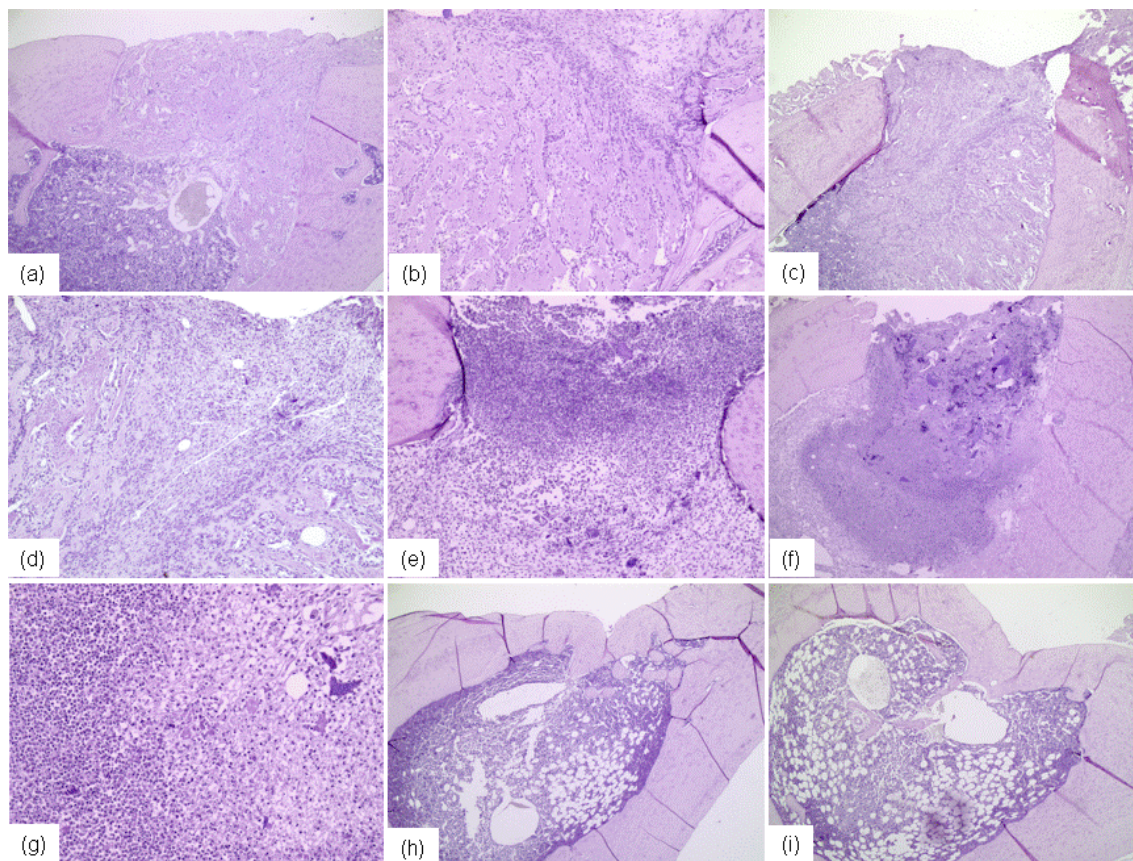


Figure 2 Figure 2 - Histopathological parameters assessed within the different groups and experimental periods. Hematoxylin and eosin staining. (a-g) 7 days. (a) Control group, 40X. Intense immature bone tissue deposition, closing the surgical cavity; (b) 100X magnification of (a), showing mild chronic inflammatory infiltrate surrounded by bone tissue neoformation; (c) 10 mg of non-infected debris 40X. Absence of abscess areas; incomplete surgical cavity closure; (d) 200X magnification of (c) – immature bone tissue deposition and chronic inflammatory infiltrate; (e) 5 mg of infected debris, 100X. Abscess formation in a superficial area of surgical cavity, intense acute inflammatory infiltrate; (f) 20mg of infected dentin. 40X. Extensive abscess formation within the surgical cavity. (g) 200X magnification of (f), showing severe inflammatory infiltrate, and presence of dentin debris. (h) 30 days, non-infected debris (i) 60 days, infected debris. Both areas demonstrating the complete hard tissue deposition, with complete healing of surgical area.

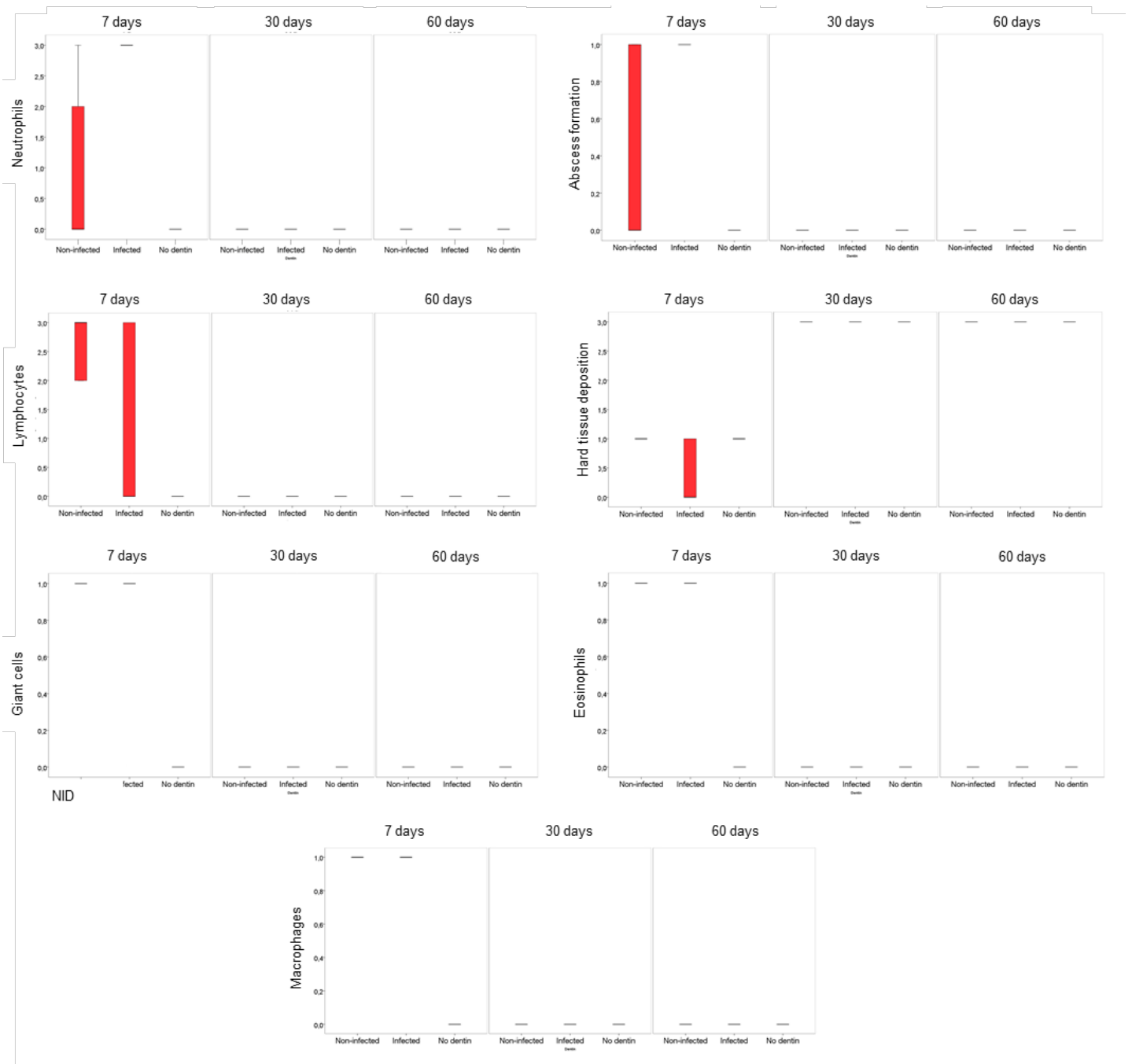


Figure 3 Box-plot graphs of the interaction of the time of evaluation and the presence and the bacteriological status of the dentine on the evaluated inflammatory parameters and hard tissue deposition.

5 Considerações Finais

A afirmação, comumente aceita, de que a quantidade de debris de dentina extruídos apicalmente pode afetar negativamente o reparo tecidual, não foi validado no presente estudo.

A presença de debris de dentina infectados, independentemente da quantidade avaliada, pode aumentar a frequência e a severidade dos parâmetros inflamatórios agudos, especialmente nos períodos iniciais em contato com os tecidos; no entanto, a longo prazo, estes efeitos negativos são atenuados e o reparo é alcançado.

De acordo com nossas descobertas, é razoável dizer que a comunidade científica endodôntica tem realmente atribuído um papel não comprovado para o fenômeno dos estudos sobre a extrusão apical de debris.

Em outras palavras, o raciocínio central usado pelos estudos de extrusão apical *in vitro* tem sido aceito com base em uma ideia não testada experimentalmente.

A dentina infectada pode desencadear alguns parâmetros inflamatórios, principalmente nos primeiros 7 dias de contato com o tecido;

A longo prazo, esses efeitos negativos diminuem e o reparo completo é alcançado.

Referências

- AHN, S.Y.; KIM, H.C.; KIM, E. Kinematic effects of nickel-titanium instruments with reciprocating or continuous rotation motion: A systematic review of in vitro studies. **Journal of Endodontics**, v.42, n.7, p.1009-17, 2016.
- AKSEL, H.; KUÇUKKAYA.; EREN, S.; ÇAKAR, A.; SERPER, A.; OZKUYUMCU, C.; AZIM, A. A. Effect of Instrumentation Techniques and Preparation Taper on Apical Extrusion of Bacteria. **Journal of Endodontics**, v.43, n.6, p.1008–10, 2017.
- ALTUNDASAR, E.; NAGAS, E.; UYANIK, O.; SERPER, A. Debris and irrigant extrusion potential of 2 rotary systems and irrigation needles. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, and Oral Radiology**, v.112, n.4 p.112e31-e35, 2011.
- ALVES, F.R.F.; PAIVA, P.L.; ALVES, M.F.N.; CABREIRA, L.J.; LIMA, K.C.; SIQUEIRA, J.F.; ROÇAS, I.N., PROVENZANO, J.C. Bacteria and Hard Tissue Debris Extrusion and Intracanal Bacterial Reduction Promoted by XP-endo Shaper and Reciproc Instruments. **Journal of Endodontics**, v.44, n.7, p.1173-1178, 2018.
- ARSLAN, H.; DOGANAY, E.; ALSANCAK, M.; CAPAR, I.D.; KARATAS, E.; GUNDUZ, H.A. Comparison of apically extruded debris after root canal instrumentation using Reciproc instruments with various kinematics. **International Endodontic Journal**, v.49, n.3, p.307–10, 2016.
- ASSMANN, E.; BÖTTCHER, D.E.; HOPPE, C.B.; GRECCA, F.S.; KOPPER, P.M. Evaluation of bone tissue response to a sealer containing mineral trioxide aggregate. **Journal of Endodontics**, v.41, n.1, p.62-6, 2015.
- BERUTTI, E.; CHIANDUSSI, G.; PAOLINO, D.S.; SCOTTI, N.; CANTATORE, G.; CASTELLUCCI, A.; PASQUALINI, D. Canal shaping with WaveOne Primary reciprocating files and ProTaper system: a comparative study. **Journal of Endodontics**, v.38, n.4, p.505-9, 2012.
- BOIJINK, D.; COSTA, D.D.; HOPPE, C.B.; KOPPER, P.M.P.; GRECCA, F.S. Apically Extruded Debris in Curved Root Canals Using the WaveOne Gold Reciprocating and Twisted File Adaptive Systems. **Journal of Endodontics**, v.44, n.8, p.1289-1292, 2018.
- BONACCORSO, A.; CANTATORE, G.; CONDORELLI, G.G.; SCHAFER, E.; TRIPI, T.R. Shaping ability of four nickel-titanium rotary instruments in simulated S-shaped canals. **Journal of Endodontics**, v.35, n.6, p.883–6, 2009

BORGES, A.H.; PEREIRA, T.M.; PORTO, A.N.; DE ARAÚJO ESTRELA, A.C.R.; MIRANDA PEDRO, F.L.; ARANHA, A.M.; GUEDES, O.A. The influence of cervical preflaring on the amount of apically extruded debris after root canal preparation using diferente instrumentation systems. **Journal of Endodontics**, v.42, n.3, p.465–9, 2016.

BURKLEIN, S.; BENTEN, S.; SCHAFER, E. Quantitative evaluation of apically extruded debris with different single-file systems: Reciproc, F360 and OneShape versus Mtwo. **International Endodontic Journal**, v.47, n.5 p.405–9, 2013.

BURKLEIN, S.; SCHAFER, E. Apically extruded debris with reciprocating single-file and full-sequence rotary instrumentation systems. **Journal of Endodontics**, v.38, n.6 p.850–2, 2012.

CAPAR, I.D.; ARLAN, H.; AKCAY, M.; ESTAS, H. An In Vitro Comparison of apically extruded of debris and instrumentation times with Protaper Universal, Protaper Next, Twisted File Adaptive , and HyFlex Instruments. **Journal of Endodontics**, v.40, n.10, p.1638-41, 2014.

CAVIEDES- BUCHELI, J.; CASTELLANOS, F.; VASQUEZ, N.; ULATE, N.; MUNOZ, H.R. The influence of two reciprocating single-file and two Rotary- file systems on the apical extrusion of debris and its biological relationship with symptomatic apical periodontitis. A systematic review and meta- analysis. **International Endodontic Journal**, v.49, n.3, p.255-270, 2016.

CAVIEDES-BUCHELI, J.; MUNOZ, H.R.; AZUERO-HOLGUIN, M.M. Neuropeptides in dental pulp: the silent protagonists. **Journal of Endodontics**, v.34, n.7, p.773-88, 2008.

CHAPMAN, C.E.; COLLEE, J.G.; BEAGRIE, G.S. A preliminary report on the relation between apical infection and instrumentation in endodontics. **Journal of the British Endodontic Society**, v.2, n.1, p.7-11, 1968.

CIÇEK, E.; AKKOCAN, O.; FURUNCUOGLU, F. Comparison of apically extruded debris associated with several nickel-titanium systems after determining working length by apex locator. **Journal of Conservative Dentistry**, v.19, n.1, p.68-71, 2016.

CINTRA, L.T.; DE MORAES, I.G.; ESTRADA, B.P.; GOMES-FILHO, J.E.; BRAMANTE, C.M.; GARCIA R.B.; BERNARDINELLI, N. Evaluation of the tissue response to MTA and MBPC: Microscopic analysis of implants in alveolar bone of rats. **Journal of Endodontics**, v.32, n.6, p.556–9, 2006.

COSTA, E.L.; SPONCHIADO JÚNIOR, E.C.; GARCIA, L.F.R.; MARQUES, A.A.F. Effect of large instrument use on shaping ability and debris extrusion of rotary and reciprocating systems. **Journal of Investigative and Clinical Dentistry**, v.9, n.1 p.1-8, 2017.

DAGNA, A.; ABED, E. R.; HUSSAIN, S.; ABU-TAHUN, I.H.; VISAI, L.; BERTOGLIO, F.; BOSCO, F.; BELTRAMI, R.; POGGIO, C.; KIM, H.C. Comparison of apical extrusion of intracanal bacteria by various glide-path establishing systems: an *in vitro* study. **Restorative Dentistry & Endodontics**, v.2, n. 4, p.316-323, 2017.

DE-DEUS, G.; NEVES, A.; SILVA, E.J.; MEDONÇA, T.A.; LOURENÇO, C.; CALIXTO, C.; LIMA, E.J.M. Apically extruded dentin debris by reciprocating single-file and multi-file rotary system. **Clinical Oral Investigations**, v.19, n.2, p.357-61, 2014.

DE-DEUS, G.; BRANDÃO, M.C.; BARINO, B.; DI –GIORGI, K.; FIDEL, R.A.; LUNA A.S. Assessment of apically extruded debris produced by the single-file ProTaper F2 technique under reciprocating movement. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v.110, n.3, p.390-4, 2010.

EHSANI, M.; FARHANG, R.; HARANDI, A.; TAVANAFAR, S.; RAOOF, M.; GALLEDAR, S. Comparison of Apical Extrusion of Debris by Using Single-File, Full-Sequence Rotary and Reciprocating Systems. **Journal of Dentistry of Tehran**, v.13, n.6, p.394-399, 2016.

ELMSALLATI, E.A.; WADACHI, R.; SUDA, H. Extrusion of debris after use of rotary nickel-titanium files with different pitch: a pilot study. **Australian Endodontic Journal**, v.35, n.2, p.65–9, 2009.

GERNHARDT, C.R.; EPPENDORF, K.; KOZLOWSKI, A.; BRANDT, M. Toxicity of concentrated sodium hypochlorite used as an endodontic irrigant. **International Endodontic Journal**, v.37, n.4, p.272-80, 2004.

GHIVARI, S.B.; KUBASAD, G.C.; CHANDAK, M.G.; AKARTE, N. Apical extrusion of debris and irrigant using hand and rotary systems: a comparative study. **Journal of Conservative Dentistry**, v.14, n.2, p.187–90, 2011.

GUTMANN, J.; BAUMGARTNER, C.; GLUSKIN, A.; HARTWELL G.; WALTON, R. Identify and define all diagnostic terms for Periapical/Periradicular health and disease states. **Journal of Endodontics**, v.35, n.12, p.1658-74, 2009.

KOÇAK, M.M.; ÇİÇEK, E.; KOÇAK, S.; SAĞLAM, B.C.; YILMAZ, N. Apical extrusion of debris using ProTaper Universal and ProTaper Next rotary systems. **International Endodontic Journal**, v.48, n.3, p.283-6, 2015.

KOÇAK, S.; KOÇAK, M.M.; SAĞLAM, B.C.; TÜRKER, S.A.; SAĞSEN B.; ER Ö. Apical extrusion of debris using self-adjusting file, reciprocating single-file, and 2 rotary instrumentation systems. **Journal of Endodontics**, v.39, n.10, p.1278-80, 2013.

KUSTARCI, A.; AKPINAR, K.E.; SUMER, Z.; ER, K.; BEK, B. Apical extrusion of intracanal bacteria following use of various instrumentation techniques. **International Endodontic Journal**, v.41, n.12, p.1066–71, 2008.

LABBAF, H.; MOGHADAM, K.N.; SHAHAB, S.; BASSIR, M.M.; FAHIMI, M.A. An In vitro Comparison of Apically Extruded Debris Using Reciproc, ProTaper Universal, Neolix and Hyflex in Curved Canals. **Iranian Endodontic Journal**, v.12, n.3, p.307-311, 2017.

MORETTON, T.R.; BROWN JR, C.E.; LEGAN, J.J.; KAFRAWY, A.H. Tissue reactions after subcutaneous and intraosseous implantation of mineral trioxide aggregate and

ethoxybenzoic acid cement. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.52, n.3, p. 528–33, 2000.

NEKOOOFAR, M.H.; SHEYKHREZAE, M.S.; MERAJI, N.; JAMEE, A.; JAMEE, A.S.J.; DUMMER, P.M.H. Comparison of the effect of root canal preparation by using WaveOne and ProTaper on postoperative pain: a randomized clinical trial. **Journal of Endodontics**, v.41, n.5, p.575-8, 2015.

OZSU, D.; KARATAS, E.; ARLAN, H.; TOPCU, M.C. Quantative evalution of apically extruded debris during root canal instrumentation with ProTaper Universal, Protaper Next, WaveOne, and self-adjusting file systems. **European Journal of Dentistry**, v.8, n.4, p.504-508, 2014.

PARIROKH, M.; JALALI, S.; HAGHDOOST, A.A.; ABBOTT, P.V. Comparison of the effect of various irrigants on apically extruded debris after root canal preparation. **Journal of Endodontics**, v.38, n.2, p.196–9, 2012.

PEDRINHA, V.F.; BRANDÃO, J.M.S.; PESSOA, O.F.; RODRIGUES, P.A. Influence of File Motion on Shaping, Apical Debris Extrusion and Dentinal Defects: A Critical Review. **The Open Dentistry Journal**, v.12, p.189-201, 2018.

PETERS, O.A. Current challenges and concepts in the preparation of root canal systems: a review. **International Endodontic Journal**, v.30, n.8, p.559-67, 2004.

QUINTANA, R.M.; JARDINE, A.P.; GRECHI, T.R.; SOARES, R.G.; ARDENGHI, D.M.; SCARPARO, R.K.; GRECCA, F.S.; KOPPER, P.M.P. Bone tissue reaction, setting time, solubility, and pH of root repair materials. **Clinical Oral Investigations**, 2018.

RAHIMI, S.; MOKHTARI, H.; SHAHI, S.; KAZEMI, A.; ASGARY, S.; EGHBAL, M.J.; MESGARIABBASI, M.; MOHAJERI, D. Osseous reaction to implantation of two endodontic cements: Mineral trioxide aggregate (MTA) and calcium enriched mixture (CEM). **Medicina Oral Patologia Oral y Cirugia Bucal**, v.17, n.5, p.907-11, 2012.

SELTZER, S.; NAIDORF, I.J. Flare-ups in endodontics: etiological factors. **Journal of Endodontics**, v.11, n.11, p.472-8, 1985.

SILVA, P.B.; KROLOW, A.M.; PILOWNIC, K.J.; CASARIN, R.P.; LIMA, R.K.P.; LEONARDO, R.T.; PAPPEN, F.G. Apical extrusion of debris and irrigants using different irrigation needles. **Brazilian Dental Journal**, v.27, n.2, p.192-195, 2016.

SIQUEIRA, J.F. Microbial causes of endodontic flare-ups. **International Endodontic Journal**, v.36, n.7, p.453-53, 2003.

SIQUEIRA, J.F.; ROÇAS, I.N.; FAVIERI, A.; MACHADO, A.G.; GAHYVA, S.M.; OLIVEIRA, J.C.M. Incidence of postoperative pain after intracanal procedures based on an antimicrobial strategy. **Journal of Endodontics**, v.28, n.6, p.457–60, 2002.

SOUSA, C.J.; MONTES, C.R.; PASCON, E.A.; LOYOLA, A.M.; VERSIANI, M.A. Comparison of the intraosseous biocompatibility of AH Plus, EndoREZ, and Epiphany root canal sealers. **Journal of Endodontics**, v.32, n.7, p.7656–62, 2006.

SOWMYA, H.K.; SUBHASH, T.S.; GOEL, B.R.; NANDINI, T.N.; BHANDI, S.H. Quantitative assessment of apical debris extrusion and intracanal debris in the apical third, using hand instrumentation and three rotary instrumentation systems. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v.8, n.2, p.206–10, 2014.

STASHENKO, P.; TELES, R.; D'SOUZA, R. Periapical inflammatory responses and their modulation. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, v.9, n.4, p.498-521, 1998.

SURAKANTI, J.R.; VENKATA, R.C.; VEMISETTY, H.; DANDOLU, R.K.; JAYA, N.K.; THOTA, S. Comparative evaluation of apically extruded debris during root canal preparation using ProTaper, Hyflex and Waveone rotary systems. **Journal of Conservative Dentistry**, v.17, n.2, p.129-32, 2014.

TANALP, J.; GÜNGÖR, T. Apical extrusion of debris: A literatur review of an inherent occurrence during root canal treatment. **International Endodontic Journal**, v.47, n.3, p.211-21, 2014.

TANALP, J.; KAPTAN, F.; SERT, S.; KAYAHAN, B.; BAYIRL, G. Quantitative evaluation of the amount of apically extruded debris using 3 different rotary instrumentation systems. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics**, v.101, n.2, p. 250-7, 2006.

TASDEMİR, T.; ER, K.; CELİK, D.; AYDEMİR, H. An in vitro comparison of apically extruded debris using three rotary nickel-titanum instruments. **Journal of dental Science**, v.5, n.3, p.121-5, 2010.

TAVARES, C.O.; BEOTTCHER, D.E.; ASSMANN, E.I.; KOPPER, P.M.P.; FIGUEIREDO, J.A.P.; GRECCA, F.S.; SCARPARO, R.K. Tissue Reactions to a New Mineral Trioxide Aggregate–containing Endodontic Sealer. **Journal of Endodontics**, v.39, n.3, p.653-7, 2013.

TEIXEIRA, J.M.; CUNHA, F.M.; JESUS, R.O.; SILVA, E.J.N.L.; FIDEL, S.R.; SASSONE, L.M. Influence of working length and apical preparation size on apical bacterial extrusion during reciprocating instrumentation. **International Endodontic Journal**, v.48, n.7, p.648–53, 2015.

TINAZ A.C.; ALACAM T.; UZUN O. The effect of disruption of apical constriction on periapical extrusion. **Journal of Endodontics**, v.31, n.7, p.533–5, 2005.

TINOCO, J.M.; DE-DEUS, G.; TINOCO, E.M.B.; SAAVEDRA, F.; FIDEL, R.A.S.; SASSONE, L.M. Apical extrusion of bacteria when using reciprocating single-file and rotary multifile instrumentation systems. **International Endodontic Journal**, v.47, n.6, p.560–6, 2013.

TOPÇUOĞLU, H.S.; AKTI A.; TUNKAY O.; DİNÇER A.N.; DUZGUN S.; TOPÇUOĞLU G. Evaluation of debris extruded apically during the removal of root canal filling

material using ProTaper, D-RaCe, and R-Endo rotary nickel-titanium retreatment instruments and hand files. **Journal of Endodontics**, v.40, n.12, p.2066-9, 2014.

TOPCUOGLU, H.S.; ZAN, R.; AKPEK, F.; TOPCUOGLU, G.; ULUSAN, O.; AKITI, A. DÜZGÜN, S.; AĞIRNASLIGIL, M. Apically extruded debris during root canal preparation using Vortex Blue, K3XF, ProTaper Next and Reciproc instruments. **International Endodontic Journal**, v.49, n.12, p.1183–7, 2016.

TOYOGLU, M.; ALTUNBAS, D. Influence of different kinematics on apical extrusion of irrigant and debris during canal preparation using K3XF instruments. **Journal of Endodontics**, v.43, n.9, p.1565–8, 2017.

USLU, G.; OZYUREK, T.; YILMAZ, K.; GUNDOGAR, M.; PLOTINO, G. Apically Extruded Debris during Root Canal Instrumentation with Reciproc Blue, HyFlex EDM, and XP-endo Shaper Nickel-titanium Files. **Journal of Endodontics**, v.44, n.5, p. 856-859, 2018.

VAUDT, J.; BITTER, K.; NEUMANN, K.; KIELBASSA, A.M. Ex vivo study on root canal instrumentation of two Rotary nickel-titanium systems in comparison to stainless steel hand instruments. **International Endodontic Journal**, v.42, n.1, p.22–33, 2009.

WALIA, H.M.; BRANTLEY, W.A.; GERSTEIN, H. An initial investigation of the bending and torsional properties of nitinol root canal files. **Journal of Endodontics**, v.14, n.7, p.346-51, 1988.

WANG, R.; SHEN, Y.; MA, J.; HUANG, D.; ZHOU, X.; GAO Y.; HAAPASALO, M. Evaluation of the Effects of Needle position on irrigant flow in the C-shaped root canal using a computational fluid dynamics model. **Journal of Endodontics**, v.41, n.6, p.931-936, 2015.

WESTERN, J.S.; DICKSIT, D.D. Apical extrusion of debris in four different endodontic instrumentation systems: A meta-analysis. **Journal of Conservative Dentistry**, v.20, n.1, p.30-36, 2017.

YARED G. Canal preparation using only one Ni-Ti Rotary instrument: preliminar observations. **International Endodontic Journal**, v.41, n.4, p.339-44, 2008.

Apêndices

Apêndice A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

TERMO DE ESCLARECIMENTO E CONSENTIMENTO

Gostaria de convidá-lo a doar o seu dente extraído para que possa ser incluído na pesquisa "**Avaliação histológica da resposta tecidual a debris de dentina**". Este dente será utilizado em pesquisas de laboratório apenas, com o objetivo de melhor entendermos a resposta ao tratamento de canal nos tecidos que ficam em volta dos dentes. A coleta do dente será realizada logo depois sua extração. Todo material coletado, bem como as informações relacionadas a este serão tratadas com o mais absoluto sigilo e confidencialidade, preservando a sua identidade. Além disso, a divulgação dos dados dessa pesquisa trará benefícios relacionados ao tratamento de canal no futuro. Você não terá que pagar, nem será remunerado pela doação do seu dente, e após a realização desta pesquisa, o dente será descartado de modo apropriado ou doado a um Banco de Dentes. Os riscos e/ou desconforto da doação são aqueles associados aos procedimentos da extração que não têm qualquer relação com a pesquisa, e nem haverá necessidade de procedimentos adicionais àqueles inerentes à extração do dente.

Eu _____, portador(a) da cédula de identidade nº _____, SSP/____, concordo de livre e espontânea vontade em participar do estudo acima mencionado.

Declaro que todas minhas dúvidas foram respondidas e, se eu precisar poderei solicitar esclarecimentos de outras dúvidas que possam surgir durante a pesquisa com o pesquisador responsável: Dra. Fernanda Pappen, pelo telefone (53) 984033599. Além disso, sei que tenho plena liberdade de retirar este consentimento a qualquer tempo, bem como me negar a participar da pesquisa, sem prejuízo no atendimento na Faculdade de Odontologia. Desta forma, estou autorizando a coleta do material, e caso eu tenha dúvidas ou necessite de maiores esclarecimentos serei esclarecido pela pesquisadora responsável.

Luciane Geanini Pena dos Santos (Pesquisador): _____

Prof.^a Dr.^a Fernanda Geraldo Pappen (Pesquisador responsável): _____

Assinatura do paciente doador

Pelotas, _____ de _____ de 20 _____

Este termo será impresso em duas vias, sendo uma do paciente e outra do pesquisador responsável.

Anexos

Anexo A– Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa em Animais



Pelotas, 04 de agosto de 2016

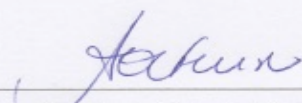
Certificado

Certificamos que a proposta intitulada "**Avaliação histológica da resposta tecidual diante a inserção de dentina contaminada e não contaminada em cavidades cirúrgicas preparadas no fêmur de ratos**", registrada com o nº23110.004329/2016-73, sob a responsabilidade de **Fernanda Geraldo Pappen** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e recebeu parecer **FAVORÁVEL** a sua execução pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, em reunião de 04/07/2016.

Finalidade	(X) Pesquisa () Ensino
Vigência da autorização	05/08/2016 a 31/12/2016
Espécie/linhagem/raça	<i>Rattus norvegicus</i> /Wistar
Nº de animais	36
Idade	4 meses
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central

Solicitamos, após tomar ciência do parecer, reenviar o processo à CEEA.

Salientamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao **COBALTO** para posterior registro no **COCEPE** (código para cadastro nº **CEEA 4329-2016**).



M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix
Presidente da CEEA

Ciente em: ____/____/2016

Assinatura do Professor Responsável: _____

Anexo B – Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

UFPEL - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação histológica da resposta tecidual a debris de dentina

Pesquisador: Fernanda G Pappen

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 91108218.3.0000.5318

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas/ FO-UFPeI

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.737.449

Apresentação do Projeto:

A extrusão apical é uma ocorrência comum durante o preparo químico mecânico, de forma que nenhum instrumento ou técnica é capaz de realizar a modelagem dos canais radiculares sem que debris sejam extravasados. Durante o preparo radicular, raspas de dentina, restos pulpares, micro-organismos e soluções irrigadoras podem extravasar o forame apical, chegando aos tecidos periapicais. No entanto, a influência dos debris extruídos na resposta tecidual periapical ainda não foi esclarecida na literatura.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar, histologicamente, a resposta tecidual diante a inserção de diferentes quantidades de dentina contaminada e não contaminada em cavidades cirúrgicas preparadas in vivo.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O presente estudo não apresenta risco - uma vez que os todos os procedimentos in vivo serão realizados respeitando as normativas do Comitê de Ética em experimentos com animais da Universidade Federal de Pelotas. Os benefícios da pesquisa ficarão esclarecidos após a obtenção dos resultados (os quais mostram-se relevantes em função da ausência deste tipo de resposta na literatura).

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa mostra-se relevante uma vez que não há evidência científica que aponte a influência da quantidade de debris extruídos no reparo tecidual.

Endereço: Rua Gonçalves Chaves, 457

Bairro: Centro

CEP: 96.015-560

UF: RS

Município: PELOTAS

Telefone: (53)3222-4439

Fax: (53)3222-4439

E-mail: cep.fop@gmail.com

UFPEL - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE



Continuação do Parecer: 2.737.449

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos de apresentação obrigatória encontram-se corretamente redigidos.

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_1146221.pdf	28/05/2018 17:10:18		Aceito
Outros	CEEA.pdf	28/05/2018 17:09:43	Fernanda G Pappen	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEdoadoresDentes.docx	28/05/2018 17:09:09	Fernanda G Pappen	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoDEBRIS.docx	28/05/2018 17:08:50	Fernanda G Pappen	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	28/05/2018 17:08:05	Fernanda G Pappen	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PELOTAS, 26 de Junho de 2018

Assinado por:
Adriana Fernandes da Silva
(Coordenador)

Endereço: Rua Gonçalves Chaves, 457

Bairro: Centro

CEP: 96.015-560

UF: RS

Município: PELOTAS

Telefone: (53)3222-4439

Fax: (53)3222-4439

E-mail: cep.fop@gmail.com