



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

AMANDA MOURÃO LEY BARROS

**PROFUNDIDADE DE PENETRAÇÃO DE DOIS CIMENTOS OBTURADORES
ENDODÔNTICOS EM FUNÇÃO DO FLUORÓFORO E DA UMIDADE
DENTINÁRIA: ESTUDO EM MICROSCOPIA CONFOCAL**

FORTALEZA-CE

2019

AMANDA MOURÃO LEY BARROS

PROFUNDIDADE DE PENETRAÇÃO DE DOIS CIMENTOS OBTURADORES
ENDODÔNTICOS EM FUNÇÃO DO FLUORÓFORO E DA UMIDADE DENTINÁRIA:
ESTUDO EM MICROSCOPIA CONFOCAL

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Odontologia. Área de concentração: Clínica Odontológica.

Orientador: Prof. Dr. Bruno Carvalho de Vasconcelos.

FORTALEZA-CE

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- B273p Barros, Amanda Mourão Ley.
Profundidade de penetração de dois cimentos obturadores endodônticos em função do fluoróforo e da umidade dentinária: : estudo em microscopia confocal / Amanda Mourão Ley Barros. – 2019.
52 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Fortaleza, 2019.
Orientação: Prof. Dr. Bruno Carvalho de Vasconcelos.
1. Endodontia. 2. Cimentos dentários. 3. Microscopia confocal. 4. Corantes fluorescentes. I. Título.
CDD 617.6
-

Dedico a Deus por confiar a mim esse grande desafio. À minha família por me apoiar nesta caminhada. Ao meu esposo pela paciência e apoio.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a **DEUS**, que em sua infinita bondade me deu forças para agir e vencer cada desafio desta caminhada, permitindo que eu ganhasse confiança em mim mesma, acreditando na minha riqueza interior para que eu pudesse perceber que todo esse sonho se concretizaria.

A toda minha família, que sempre esteve ao meu lado e torceu pelo meu sucesso. Em especial a minha mãe, **MARIA FABÍOLA FONSÊCA MOURÃO TEIXEIRA**, exemplo de garra, superação e amor, com a qual aprendi a perseguir meus sonhos com brandura e perseverança. A minha irmã, **ANDRESSA MOURÃO LEY**, que amo muito e que tornou os momentos difíceis mais leves com o seu jeito de ser. Não menos importante, meu amado padrasto **JOSÉ AMÉRICO TEIXEIRA** (*in memoriam*), que na sua finita trajetória ao nosso lado me ensinou que a humildade é cabível em todos os lugares.

Ao meu esposo, **JEAN CLAUDE NOBRE BARROS**, parceiro forte de todas as horas, que esteve sempre ao meu lado nesses 17 anos, sempre me levantando com palavras de incentivo e amor. Obrigada por entender os momentos de ausência e sempre torcer pela minha realização profissional. Sua dedicação e amor incondicional me fazem ter forças para acreditar no amanhã. Agradeço por lhe ter ao meu lado, por poder compartilhar alegrias e tristezas e saber que a qualquer momento de nossas vidas posso contar com você.

Aos meus sogros **NILSON BARROS DA SILVA** e **LUCIENE NOBRE BARROS**, por terem me recebido como uma filha e por me ensinarem a importância da dedicação à família.

Em especial ao meu orientador, **DR. BRUNO CARVALHO DE VASCONCELOS**, por todo o apoio e conhecimento transmitido. Agradeço a oportunidade de ser sua orientada e poder conviver com esse profissional competente e primoroso.

À Faculdade de Farmácia, Enfermagem e Odontologia da Universidade Federal do Ceará e ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia por ter me proporcionado a realização do mestrado e por toda ajuda durante o decorrer do curso.

À professora, **DRA. MÔNICA SAMPAIO DO VALE**, pela disponibilidade em me receber nos estágios à docência, sempre demonstrando muito afinho em me ensinar a arte de lecionar.

Ao professor, **ELILTON CAVALCANTE PINHEIRO JUNIOR**, pela disponibilidade em participar da banca avaliadora desta defesa. Agradeço, antecipadamente, as valiosas contribuições para o trabalho.

À minha dupla de mestrado, **FRANCISCA LÍVIA PARENTE VIANA**, obrigada pelo apoio nos momentos difíceis e pelas palavras de incentivo. Você é uma amiga especial que merece todo o sucesso. A **LUCIANA MARIA ARCANJO FROTA**, por ter sido a parceira que tanto precisei nos momentos mais difíceis dessa caminhada, uma amizade sincera que espero que se perpetue.

Aos amigos de pós-graduação **IANA SÁ DE OLIVEIRA, MARIA TAYARA MARQUES DE FREITAS, BRENO CAVALCANTE MARTINS** pelo apoio incondicional nessa jornada. Ela não teria sido a mesma sem vocês. E todos os demais colegas do mestrado que somaram esforços nessa trajetória.

Aos servidores da Central Analítica-UFC/CT-INFRA/MCTI-SISNANO/Pró-Equipamentos CAPES, **DR^a. ROSEMEYRE FREIRE, MSC. JOÃO VICTOR SERRA NUNES E MSC. MARLOS DE MEDEIROS CHAVES** que, com muita competência e disponibilidade, realizaram os estudos de microscopia confocal e microscopia eletrônica, estudos indispensáveis para meu trabalho.

Ao servidor da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Ceará, **DAVI QUEIROZ DE FREITAS**, que sempre esteve disponível para auxiliar no manuseio dos equipamentos do laboratório da PPGO/UFC.

Aos amigos de graduação, em especial **BRUNA ALBUQUERQUE GARCIA e JÉSSICA RODRIGUES MENDES CARNEIRO**, que se tornaram exemplos de profissionais e sempre se fizeram presentes ao longo desses anos de amizade sincera.

Por fim, agradeço aos demais amigos que de certa forma contribuíram na minha caminhada até aqui.

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi o de determinar a profundidade de penetração nos túbulos dentinários proporcionada por dois cimentos obturadores endodônticos em função da umidade presente no sistema de canais radiculares e do fluoróforo empregado. Para tal, canais radiculares das raízes distovestibulares de 40 molares superiores humanos foram preparados (Reciproc R25) e obturados com cones de guta-percha associados aos cimentos AH Plus (AH) e Endofill (EF) incorporados com dois fluoróforos, Rodamina-B (ROD) e Fluo-3 (F3); os mesmos foram misturados simultaneamente aos cimentos no momento da manipulação (0,1 g/g). Os espécimes foram randomicamente divididos em 4 grupos ($n = 10$) em função do cimento (AH/EF) e da condição do substrato dentinário (úmido/seco). As raízes que mantiveram substrato úmido foram secas unicamente com breve aspiração, seguida de cones de papel absorvente; para remoção da umidade, as raízes foram mantidas em estufa a 70° C por 7 dias. Sete dias após a obturação, os espécimes foram seccionados transversalmente a 2, 4 e 6 mm do ápice anatômico; as secções foram preparadas e levadas ao Microscópio Confocal de Varredura a Laser para determinação da profundidade de penetração dos cimentos nos túbulos dentinários (mm) no software Image J. Observou-se na análise estatística multifatorial superioridade para o cimento AH Plus que apresentou maior penetração nos túbulos dentinários, quando comparado ao cimento Endofill ($P < 0,05$), todavia, não foram observadas diferenças significantes quanto ao fluoróforo utilizado (ROD/F3) ou à condição de umidade da dentina ($P > 0,05$). Em relação aos terços foram observadas diferenças estatisticamente significantes, tendo o terço apical apresentado menor penetração quando comparado aos demais ($P < 0,05$). Nas condições do estudo pôde-se concluir que o cimento AH Plus apresentou maior penetração intratubular que o cimento Endofill, independentemente das outras variáveis testadas - a umidade ou o fluoróforo - que não interferiram na penetração; ainda, as maiores penetrações foram observadas nos terços cervical e médio.

Palavras-chave: Endodontia. Cimentos dentários. Microscopia confocal. Corantes fluorescentes.

ABSTRACT

The objective of the present study was to determine the depth of penetration in the dentin tubules provided by two endodontic obturator cements as a function of the moisture present in the root canal system and the fluorophore used. For this, root canals of the 40 upper molar distobuccal roots were prepared (Reciproc R25) and filled with gutta-percha cones associated with AH Plus (AH) and Endofill (EF) cements incorporated with two fluorophores, Rhodamine-B) and Fluo-3 (F3); they were mixed simultaneously to the cements at the time of manipulation (0.1g/g). The specimens were randomly divided into 4 groups (n = 10) as a function of cement (AH / EF) and the condition of the dentin substrate (wet / dry). The roots that maintained moist substrate were dried only with brief aspiration followed by cones of absorbent paper; for moisture removal the roots were kept in an oven at 70°C for 7 days. Seven days after obturation the specimens were sectioned transversely at 2, 4 and 6 mm of the anatomic apex; the sections were prepared and taken to the Confocal Laser Scanning Microscope to determine the depth of penetration of the dentin tubules (mm) in the Image J. software. The multifactor analysis showed superiority for the AH Plus cement, which presented greater penetration in the ($P < 0.05$), however, no significant differences were observed regarding the fluorophore used (ROD / F3) or the dentin moisture condition ($P > 0.05$). In relation to the thirds, statistically significant differences were observed, with the apical third presenting less penetration when compared to the others ($P < 0.05$). Under the conditions of the study, it was possible to conclude that the AH Plus cement presented higher intratubular penetration than the Endofill cement, independent of the other variables tested - moisture or fluorophore - that did not interfere with penetration; the highest penetrations were observed in the cervical and middle thirds.

Keywords: Endodontics. Dental Cements. Confocal Microscopy. Fluorescent Dyes.

LISTA DE ABREVIACÕES

CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
Ca ⁺	Íons cálcio
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
DDS	Doctor of Dental Surgery
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
ISSN	International Standard Serial Number
JCE	Junção cimento-esmalte
LED	Light Emitting Diode
MCON	Microscópio eletrônico confocal de varredura à Laser
MEV	Microscópio eletrônico de varredura
mm	Milímetro
mL	Mililitro
MSc	Mestrado
nm	nanômetro
PUI	Passive Ultrasonic Irrigation (Irrigação Ultrassônica Passiva)
RPM	Rotações por minuto
SCR	Sistema de canais radiculares
TIFF	Tagged Image File Format
UFC	Universidade Federal do Ceará
µm	Micrômetro
° C	Grau Celsius

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	11
2. OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo geral	16
2.2 Objetivos específicos	16
3. HIPÓTESE	17
3.1 Hipótese nula	17
3.2 Hipótese alternativa	17
4. CAPÍTULO	18
4.1 Capítulo 1	19
5. CONCLUSÃO GERAL	36
REFERÊNCIAS	37
ANEXO 1	42
ANEXO 2	45

1. INTRODUÇÃO GERAL

O tratamento endodôntico tem por objetivo principal a máxima redução dos microrganismos instalados no sistema de canais radiculares (SCR) e a prevenção de sua recontaminação durante e após o tratamento (PETERS *et al.*, 2002; HÜLSMANN *et al.*, 2005; AVERBACH; KLEIER, 2006). Assim, para se alcançar o sucesso da terapia endodôntica, todas as etapas devem ser cuidadosamente realizadas, sendo inquestionável sua interdependência de forma que uma condução criteriosa e adequada a cada passo favorece o sucesso do tratamento, tanto do ponto de vista clínico, quanto do ponto de vista radiográfico e biológico (SIQUEIRA; RÔÇAS, 2008). Desta forma, a eliminação da infecção do canal radicular propicia um ambiente favorável ao reparo das alterações periapicais, enquanto que a persistência de micro-organismos exerce um papel relevante nos insucessos do tratamento endodôntico (CHEN *et al.*, 2017).

É sabido que não há como esterilizar o SCR, uma vez que é impossível obter-se uma completa eliminação bacteriana (GHARIB *et al.*, 2007). Para a obturação do SCR, recai então a finalização do tratamento com o propósito de realizar um selamento o mais efetivo possível, tridimensionalmente, utilizando de preferência materiais biocompatíveis, eliminando vias de infiltração nas direções coronais e apicais sendo capaz de sepultar as bactérias remanescentes e preencher todo o espaço do SCR (MAMOOTIL *et al.*, 2007; GHARIB *et al.*, 2007).

Neste sentido a obturação é realizada lançando-se mão da associação entre um cone, material em estado sólido, e um cimento, material em estado plástico. Esses cimentos endodônticos devem preencher o espaço do canal radicular lateral e apicalmente e ter uma boa adaptação à dentina (GUIMARÃES *et al.*, 2014; KUÇI *et al.*, 2014). Já os materiais em estado sólido, representados principalmente pelos cones de guta-percha, são caracterizados pela insolubilidade e estabilidade dimensional, todavia, apresentando pouca adaptação às paredes dentinárias (TOPÇUOĞLU *et al.*, 2014; CAMILLERI J, 2015).

Sendo os responsáveis pelo selamento e adaptação da obturação às irregularidades anatômicas do SCR, grande importância recai sobre os cimentos, majoritariamente sobre sua capacidade de selamento (MAMOOTIL *et al.*, 2007). Para tal, os cimentos obturadores deveriam apresentar grande afinidade à dentina radicular e características que proporcionassem seu escoamento tanto a nível macro quanto microscópico,

fundamentalmente nos túbulos dentinários. Desta forma, poderiam efetivamente confinar os microrganismos remanescentes e impedir sua chegada, ou de suas toxinas à região apical, ou ainda a chegada de substrato aos mesmos (CHEN *et al.*, 2017). A esse respeito, alguns autores afirmam que a penetração dos cimentos nos túbulos dentinários é influenciada por uma série de fatores que incluem a remoção da “smear layer” (KOKKAS *et al.*, 2004), a técnica de obturação (DE DEUS *et al.*, 2004) e as propriedades físico-químicas dos cimentos (VITTI *et al.*, 2013).

Logo, para obtenção de um selamento tridimensional efetivo, deve-se realizar uma obturação desprovida de espaços vazios (VENTURI *et al.*, 2006, MULIYAR *et al.*, 2014), evitando a infiltração tanto no sentido ápice-coroa quanto no sentido coroa-ápice (MARCIANO *et al.*, 2011; KIM *et al.*, 2010). Todavia, até o presente, a literatura não aponta nenhum material, associação, ou técnica de obturação que seja capaz de promover um selamento total do SCR (SIQUEIRA *et al.*, 2010, MULIYAR *et al.*, 2014, PEREIRA *et al.*, 2017).

O cimento endodôntico ideal deve apresentar as seguintes propriedades: ser de fácil manipulação, passível de uso em diferentes técnicas de manipulação, ser insolúvel aos fluídos bucais, apresentar estabilidade dimensional e não degradar com o tempo, ser radiopaco, apresentar adesividade às paredes do canal sem ser afetado por agentes oxidantes, não apresentar contração de polimerização, apresentar biocompatibilidade, ser de fácil remoção em caso de retratamento e aumentar a resistência radicular. Infelizmente, um cimento que apresente todos esses critérios ainda não foi desenvolvido (WANG *et al.*, 2018).

Para De Deus *et al.* (2003), a grande maioria dos cimentos apresentam características indesejáveis como: solubilidade, instabilidade dimensional e toxicidade aos tecidos periapicais, porém, são os responsáveis pela aderência da massa obturadora, em maior ou menor escala, às paredes do canal e entre os cones de guta-percha. Neste sentido, anos antes, Gound *et al.* (2000) afirmavam que a obturação deveria apresentar o máximo de volume possível de guta-percha, com mínima quantidade de cimento. Idealmente, o cimento obturador deve preencher as irregularidades da interface guta-percha/parede dentinária formando uma fina camada, uniformemente distribuída no intuito de prevenir infiltração apical (SALEH *et al.*, 2003; LI *et al.*, 2014).

Com o objetivo de aperfeiçoar o preparo do sistema de canais radiculares, foi proposta em 2000 uma nova geração de instrumentos de NiTi, acionados com o movimento recíprocante, confeccionados em liga NiTi M-Wire capazes de preparar o canal com um único instrumento (BÜRKLEIN *et al.*, 2012; KIM *et al.*, 2012; PEDULLÀ *et al.*, 2013; SHEN *et al.*, 2013; VERSIANI *et al.*, 2013; BÜRKLEIN *et al.*, 2014). Com seu emprego, o tempo de preparação dos condutos foi reduzido em até 60%, reduzindo o tempo de modelagem e, conseqüentemente, o tempo disponível de irrigação e debridamento químico do SCR (YOU *et al.*, 2010). O emprego de maiores volumes de solução irrigadora e adicionalmente a ativação desta é aconselhável para melhorar a dissolução de matéria orgânica dentro dos condutos e a desinfecção dos mesmos (HULSMANN *et al.*, 2003; PAQUÉ *et al.*, 2009)

Após o preparo do SCR com instrumentos recíprocantes, técnicas de obturação com cone único do sistema têm sido investigadas principalmente em relação ao percentual de área do canal preenchida por guta-percha e cimento (GORDON *et al.*, 2005; SCHÄFER *et al.*, 2012). Em canais com secção transversal circular, essas técnicas proporcionam boa capacidade de preenchimento (ROMANIA *et al.*, 2009; SCHÄFER *et al.*, 2012), todavia, em canais irregulares e/ou achatados podem acarretar espaços vazios e maior volume de cimento na obturação (SCHÄFER *et al.*, 2012).

O cimento AH Plus (Dentsply/Detrey GmbH, Konstanz, Alemanha), material de base resinosa (epóxi-amina), tem sido considerado o padrão ouro, dentre seus pares, por possuir boa capacidade de escoamento, selamento marginal e adaptação às paredes do canal radicular (VERSIANI *et al.*, 2006; RESENDE *et al.*, 2009; NAGAS *et al.*, 2009; DE-DEUS *et al.*, 2012, MARCIANO *et al.*, 2011a), biocompatibilidade e ação antibacteriana (SILVEIRA *et al.*, 2011). O Endofill, cimento à base de óxido de zinco e eugenol, apresenta uso de longa data na literatura de modo satisfatório, particularmente pelo custo, apesar da baixa biocompatibilidade e reduzida coesão entre as suas partículas. Apresenta também baixa resistência de união à dentina, o que pode ocasionar falhas na massa obturadora (DE OLIVEIRA *et al.*, 2003; TEDESCO *et al.*, 2014).

Tendo em vista o papel da penetração nos túbulos por parte dos cimentos obturadores no selamento marginal alcançado com o tratamento, alguns autores têm sugerido métodos para sua determinação (BALGUERIE *et al.*, 2011; KUÇI *et al.*, 2014; JEONG *et al.*, 2017; TEDESCO *et al.*, 2018). Neste sentido, com o intuito de investigar a interface dentária de canais radiculares preenchidos com cimentos experimentais a base

de cimento Portland, usando um veículo à base de resina epóxi em comparação com o AH Plus, Viapiana *et al.* (2014) utilizaram 3 métodos de avaliação da capacidade de adaptação e penetração de materiais seladores endodônticos às paredes dos canais radiculares. Utilizaram o Microscópio Eletrônico Confocal de Varredura a Laser (MCON), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de dispersão de energia (EDS). Patel *et al.* (2007) e Gharib *et al.* (2007) realizaram experimentos utilizando o MCON e concluíram que as imagens produzidas por esse método apresentam vantagens por fornecerem informações mais detalhadas sobre a presença e distribuição dos cimentos dentro dos túbulos dentinários e na circunferência total das paredes do canal radicular por meio da utilização do marcador fluorescente Rodamina-B.

Desde então, a Rodamina-B tem sido o fluoróforo mais amplamente empregado na literatura, quando da utilização do MCON, para determinar a profundidade de penetração nos túbulos dentinários de cimentos endodônticos e avaliar a adaptação e a qualidade da obturação do canal radicular (ORDINOLA-ZAPATA *et al.*, 2009; MARCIANO *et al.*, 2011a; MARCIANO *et al.*, 2011b; CHANDRA *et al.*, 2012; GUIMARÃES *et al.*, 2014).

Recentemente, Jeong *et al.* (2017) avaliaram a profundidade de penetração de um cimento à base de silicato tricálcico em túbulos dentinários, usando 3 diferentes técnicas de obturação. Em seu estudo empregaram o Fluo-3 em detrimento da Rodamina-B. Sua mais importante propriedade nessa aplicação é a formação de um espectro de absorção compatível com excitação a 506 nm por fontes de Laser de íons argônio, resultando num aumento da intensidade de fluorescência em resposta à ligação com íons Ca^{2+} . O Fluo-3 já havia sido empregado na luminescência à dinâmica das reações envolvendo a sinalização de íons Ca^{2+} (BOOTMAN *et al.*, 1997; THOMAS *et al.*, 2000). O Fluo-3 também tem sido amplamente utilizado para citometria de fluxo (JUNE *et al.*, 1994), assim como para experimentos envolvendo fotoativação de quelantes sinalizados, segundos mensageiros e neurotransmissores (CHATTON *et al.*, 1998).

O surgimento dessa opção à Rodamina-B advém da ausência de estudos que a comparem com outro fluoróforo ou que comprovem que realmente é o cimento corado que penetra no túbulo e não parte do fluoróforo que por ventura possa se desprender e migrar em profundidade nos túbulos dentinários. A Rodamina-B tem a capacidade de ligar-se a componentes orgânicos como *primers*, cimentos, agentes sinalizadores e ainda sofrer solubilização na presença de água (JEONG *et al.*, 2017). Apresenta uma forte

afinidade com umidade e não apresenta a capacidade de se ligar diretamente a íons Ca^{2+} presente nos cimentos endodônticos (PIOCH *et al.*, 1997). Como resultado, pode se separar da mistura do cimento, marcar até pequenos graus de umidade na dentina, emitir fluorescência independente do cimento e mostrar uma penetração mais profunda nos túbulos dentinários, dando resultados imprecisos (JEONG *et al.*, 2017). Daí o interesse em comparar a Rodamina-B, que é um fluoróforo bastante utilizado na determinação da profundidade de penetração de cimentos endodônticos nos túbulos dentinários, com o Fluo-3, fluoróforo que apresenta capacidade de ligação aos íons Ca^{2+} presentes em cimentos endodônticos considerando diferentes condições de umidade e cimentos preparados em diferentes bases.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Determinar a profundidade de penetração intratubular de dois cimentos obturadores endodônticos em função de diferentes condições de umidade e do fluoróforo empregado.

2.2 Objetivos específicos

- Observar, por meio da Microscopia Confocal de Varredura a Laser, a profundidade de penetração alcançada pelos cimentos obturadores endodônticos AH Plus (Dentsply / Detrey GmbH, Konstanz, Alemanha) e Endofill (Dentsply Ind. Co., Petrópolis, RJ, Brasil);

- Determinar a influência da umidade, canal úmido e seco, na penetração dos cimentos obturadores testados;

- Verificar a concordância dos resultados obtidos com os fluoróforos Rodamina-B (Sigma-Aldrich, SaintLouis, MO, EUA) e Fluo-3 (Sigma-Aldrich, Warrington, PA, EUA) em função da umidade presente no SCR.

- Comparar a penetração dos cimentos nos terços em função do fluoróforo utilizado e da condição da dentina.

3. HIPÓTESE

3.1 Hipótese Nula

Considerar-se-á a hipótese nula de que cimentos obturadores AH Plus e Endofill apresentarão semelhante profundidade de penetração nos túbulos, independente da umidade; ainda, que os fluoróforos Rodamina-B e Fluo-3, utilizados como marcadores para determinação da profundidade de penetração nos túbulos dentinários dos cimentos obturadores endodônticos, não apresentarão divergências quanto à profundidade de penetração, independente da umidade presente no SCR e do seu terço.

3.2 Hipótese Alternativa

Como hipótese alternativa, será aceito que os cimentos obturadores AH Plus e Endofill apresentarão divergências na profundidade de penetração nos túbulos; ainda, que os fluoróforos Rodamina-B e Fluo-3 apresentarão divergência quanto aos resultados de profundidade de penetração em função da condição de umidade presente no SCR e do seu terço.

4. CAPÍTULO

Esta Dissertação está baseada no Artigo 46, do Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal do Ceará, que regulamenta o formato alternativo para trabalhos de conclusão de Mestrado e Doutorado (Dissertações e Teses) e permite a inserção de artigo(s) científico(s) de autoria ou coautoria do candidato.

Em função de utilizar dentes humanos extraídos, caracterizando-se como um estudo laboratorial *ex vivo*, os protocolos utilizados neste trabalho foram previamente submetidos à apreciação pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Federal do Ceará, obedecendo aos ditames da Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde, tendo sido protocolado sob o nº CAAE 97052618.0.0000.5054 e aprovado sob nº 2.888.556 (Anexo 1).

Desta forma, a presente Dissertação é composta por um artigo científico redigido de acordo com as normas estabelecidas pela revista científica escolhida.

4.1 Capítulo 1

“Profundidade de Penetração de Dois Cimentos Obturadores Endodônticos em Função do Fluoróforo e da Umidade Dentinária: Estudo em Microscopia Confocal” com título sugerido em inglês “Penetration of Two Endodontic Sealers in Function of Fluorophore and Dentin Moisture: A Confocal Microscopy Study”.

Este artigo seguiu as normas de publicação do periódico – *International Endodontic Journal* (ISSN 0143-2885).

Página de Título

Profundidade de Penetração de Dois Cimentos Obturadores Endodônticos em Função do Fluoróforo e da Umidade Dentinária: Estudo em Microscopia Confocal.

Amanda Mourão Ley Barros DDS¹, Francisca Lívia Parente Viana DDS¹, Bruno Carvalho de Vasconcelos DDS, MSc, PhD^{1,2}

¹ Programa de Pós-graduação em Odontologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil.

² Curso de Odontologia de Sobral, Universidade Federal do Ceará, *Campus* Sobral, Sobral, CE, Brasil.

Palavras-chaves: Endodontia, cimentos obturadores endodônticos, microscopia confocal de varredura a Laser, Rodamina B, Fluo-3.

Título reduzido: Fluoróforos em microscopia confocal.

Autor de correspondência:

Bruno Carvalho de Vasconcelos, DDS, MSc, PhD
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Federal do Ceará
Rua Monsenhor Furtado, 1273, Rodolfo Teófilo,
CEP: 60430-355, Fortaleza, CE, Brasil
Email: bcv@ufc.br

Agradecimentos:

Ao Prof. Dr. Paulo Goberlândio pela realização das análises estatísticas. A Central Analítica-UFC/CT-INFRA/MCTI-SISNANO/Pró-Equipamentos CAPES por viabilizar as análises em microscopia. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES). Os autores negam quaisquer conflitos de interesse relacionados a este estudo.

Profundidade de Penetração de Dois Cimentos Obturadores Endodônticos em Função do Fluoróforo e da Umidade Dentinária: Estudo em Microscopia Confocal.

RESUMO

Objetivo Determinar a profundidade de penetração nos túbulos dentinários proporcionada por dois cimentos obturadores endodônticos em função da umidade presente no sistema de canais radiculares e do fluoróforo empregado.

Metodologia Canais radiculares de raízes distovestibulares de 40 molares superiores humanos foram preparados e obturados com guta-percha associada aos cimentos AH Plus (AH) e Endofill (EF) com dois fluoróforos incorporados, Rodamina-B e Fluo-3; os mesmos foram misturados simultaneamente aos cimentos no momento da manipulação. Os espécimes foram randomicamente divididos em 4 grupos ($n = 10$) em função do cimento e da condição do substrato dentinário (úmido/seco). As raízes que mantiveram substrato úmido foram secas unicamente com breve aspiração, seguida de cones de papel absorvente; para remoção da umidade, as raízes foram mantidas em estufa a 70° C por 7 dias. Sete dias após a obturação os espécimes foram seccionados transversalmente a 2, 4 e 6 mm do ápice anatômico; as secções foram preparadas e levadas ao Microscópio Confocal de Varredura a Laser e as imagens, analisadas para determinação da profundidade de penetração dos cimentos nos túbulos dentinários (mm).

Resultados A estatística multifatorial demonstrou superioridade para o cimento AH Plus que apresentou maior penetração nos túbulos dentinários quando comparado ao Endofill ($P < 0,05$), todavia, não foram observadas diferenças significantes quanto ao fluoróforo utilizado ou à condição de umidade da dentina ($P > 0,05$). Em relação ao nível foram observadas diferenças estatisticamente significantes, tendo o terço apical apresentado menor penetração quando comparado aos demais ($P < 0,05$).

Conclusão Pôde-se concluir que o AH Plus apresentou maior penetração intratubular que o Endofill, independente das outras variáveis testadas - umidade e fluoróforo não interferiram na penetração; ainda, que as maiores penetrações foram observadas nos terços cervical e médio.

Palavras-chave: Endodontia; Cimentos obturadores endodônticos; Microscopia Confocal de Varredura a Laser; Rodamina B; Fluo-3.

INTRODUÇÃO

O objetivo fundamental da obturação do Sistema de Canais Radiculares (SCR) é vedar o canal radicular para prevenir sua reinfecção (Sjögren *et al.*, 1997). Neste contexto, os cimentos obturadores endodônticos apresentam um importante papel no preenchimento das complexidades anatômicas, aderindo às irregularidades do canal radicular e penetrando nos túbulos dentinários, exercendo as importantes funções de preencher o espaço do SCR e de sepultar as bactérias remanescentes após seu preparo (Ma *et al.*, 2011, Silva *et al.*, 2015).

A capacidade de penetração nos túbulos dentinários dos cimentos obturadores endodônticos está diretamente relacionada às propriedades físico-químicas destes. Os cimentos endodônticos à base de resinas, dentre eles o AH Plus (Dentsply/Detrey GmbH, Konstanz, Alemanha), citado como padrão ouro pela literatura, apresentam boas características físico-químicas e boa capacidade de adaptação às paredes do SCR (Marciano *et al.*, 2011, Wang *et al.*, 2014). Já os cimentos à base de óxido de zinco e eugenol, como o Endofill (Dentsply Ind. Co., Petrópolis, RJ, Brasil), apresentam capacidade de penetração nos túbulos dentinários diminuída, isso se deve provavelmente às microestruturas muito diferentes dos componentes químicos desse cimento quando comparado aos demais (Khedmat *et al.*, 2013). Apresenta uso consolidado e de modo razoável na literatura, embora apresente um certo grau de citotoxicidade e baixa biocompatibilidade, apresenta atividade antimicrobiana (De Oliveira *et al.*, 2003).

Diferentes métodos têm sido sugeridos para a determinação da profundidade de penetração intradentinária dos cimentos (Fontana *et al.*, 2009, Jeong *et al.*, 2017, Piazza *et al.*, 2018, Huang *et al.*, 2018). Dentre eles, a Microscopia Confocal de Varredura a Laser (MCON) apresenta a capacidade de avaliar a interface adesiva, as características topográficas, além da mensuração da profundidade de penetração nos túbulos dentinários (Ordiola-Zapata *et al.*, 2009). A Rodamina-B tem sido o fluoróforo mais amplamente empregado na literatura quando da realização de análises no MCON para determinação da profundidade de penetração nos túbulos dentinários de cimentos endodônticos e avaliação da adaptação e a qualidade da obturação do canal radicular (Ordinola-Zapata *et al.*, 2009, Marciano *et al.*, 2011a, Marciano *et al.*, 2011b, Chandra *et al.*, 2012, Guimarães *et al.*, 2014). Todavia, recentemente o Fluo-3 foi empregado com o mesmo propósito (Jeong *et al.*, 2017). Ele foi introduzido por Minta *et al.* em 1989, tendo sido empregado na luminescência à dinâmica das reações envolvendo a sinalização de íons Ca^{2+} (Cheng

et al., 1996, Bootman *et al.*, 1997). A mais importante propriedade do Fluo-3 nessas aplicações é a formação de um espectro de absorção compatível com excitação a 506 nm por fontes de Laser de íons argônio, resultando num aumento da intensidade de fluorescência em resposta à ligação com íons Ca^{2+} .

Em função do exposto, o objetivo do presente estudo foi o de determinar, por meio do MCON, a profundidade de penetração nos túbulos dentinários proporcionada pelos cimentos obturadores endodônticos AH Plus e Endofill em função da umidade presente no SCR (úmido/seco) e do fluoróforo empregado (Rodamina-B/Fluo-3).

MATERIAIS E MÉTODOS

Cálculo amostral

Previamente ao início do estudo, realizou-se o cálculo amostral com auxílio do programa G * Power v3.1 para Mac (Heinrich Heine; Universität Düsseldorf, Düsseldorf, Alemanha) selecionando o teste de Wilcoxon-Mann-Whitney. Os dados de um estudo anterior foram considerados (PIAZZA *et al.*, 2018) e o tamanho do efeito no presente estudo foi estabelecido (1,03). O erro tipo alfa de 0,05, um poder de 0,80 e uma razão N_2/N_1 de 1 também foram estipulados. O cálculo apontou uma amostra de 8 espécimes como o tamanho ideal requerido para notar diferenças significativas. Devido ao risco de perda de espécimes durante o preparo para o MCON, uma amostra de 10 canais por grupo foi estipulada.

Seleção da amostra e preparo químico-mecânico

Após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa Local (Protocolo #2.888.556) 40 molares superiores humanos recém-extraídos foram selecionados para serem utilizados nesta pesquisa. Todos os dentes deveriam apresentar raízes distovestibulares integras, com ápices completos (forames $< 200 \mu\text{m}$) e curvaturas inferiores a 5° (Schneider, 1971). Após a limpeza, os dentes permaneceram armazenados em solução de timol a 0,1% até o início do experimento.

Os dentes tiveram suas raízes distovestibulares seccionadas com disco diamantado dupla-face (SMART CUT; UKAM Industrial Superhard Tools, Valencia, CA, EUA) acoplado em cortadeira metalográfica (Isomet 1000; Buehler, Lake Bluff, IL, EUA) sob copiosa irrigação, logo abaixo da junção cimento-esmalte (JCE). Sob irrigação com solução hipoclorito de sódio a 2,5% (Asfer Indústria Química Ltda., São Caetano do Sul,

SP, Brasil), foi executada a exploração do canal radicular das raízes distovestibulares com limas tipo-K #10 (Dentsply/Sirona, Ballaigues, Suíça). O comprimento de trabalho foi determinado por meio da redução de 1,0 mm no comprimento real dos canais determinado pela inserção de uma lima tipo-K #10 até a visualização de sua ponta através do forame apical.

Previamente à instrumentação, todos os espécimes foram irrigados com 2,0 mL de hipoclorito de sódio a 2,5%. O preparo químico-mecânico dos terços cervical, médio e apical foi efetuado por um único operador, especialista em Endodontia, empregando a técnica coroa-ápice, utilizando instrumentos Reciproc R25 (VDW GmbH, Munique, Alemanha), acionados em motor elétrico VDW Silver (VDW GmbH) na programação “Reciproc All”; cada instrumento teve seu uso limitado a quatro condutos. Entre cada ciclo de emprego dos instrumentos foi realizada irrigação com 2,0 mL de hipoclorito de sódio, limpeza das espiras com gaze e recapitulação do comprimento real do dente com lima tipo-K #15. Após a instrumentação, foi realizada a prova dos cones de guta-percha; sendo empregados cones do mesmo sistema (VDW GmbH).

Ao final da instrumentação, os canais foram irrigados com 5 mL de hipoclorito de sódio a 2,5%, utilizando irrigação ultrassônica passiva com a técnica de fluxo intermitente; esse procedimento foi repetido por três vezes durante 20 segundos (van der Sluis *et al.*, 2007) utilizando um aparelho de ultrassom piezoelétrico (Piezon Master 200; EMS, Nyon, Geneva, Suíça) programado para potência 03 (aproximadamente 30%), munido de inserto ultrassônico liso (Irrisonic; Helse Ultrasonics, Santa Rosa do Viterbo, SP, Brasil). Em seguida, os canais receberam irrigação com 2 mL de EDTA (Biodinâmica Química e Farmacêutica Ltda., Ibiporã, PR, Brasil) a 17% por 3 minutos. Por fim, os canais foram irrigados com 5,0 mL de soro fisiológico (Eurofarma Laboratórios S.A., São Paulo, SP, Brasil) para, em seguida, serem aspirados com cânula endodôntica calibre 40 x 10 mm (Indusbello Indústria e Comércio de Produtos Médicos e Odontológicos Ltda, Londrina, PR, Brasil) por 5 segundos e secos com 2 pontas de papel absorvente estéreis Reciproc R25 (VDW GmbH).

Os espécimes foram, então, randomicamente divididos; os espécimes do grupo seco, protocolo adicional de secagem composto por armazenamento por 7 dias em estufa de secagem com temperatura calibrada para 70° C foi realizado. Finalizados os procedimentos, dentre os dentes secos (SEC) e úmidos (UM), nova divisão randômica foi realizada em função do cimento utilizado na obturação, AH Plus ou Endofill.

Obturação dos canais radiculares

As amostras foram divididas em 4 grupos ($n = 10$): AH/UM, AH/SEC, EF/UM, EF/SEC; todos os grupos tiveram a incorporação dos dois fluoróforos, Rodamina-B (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) e Fluo-3 (Sigma-Aldrich, Warrington, PA, EUA). Para tal, os cimentos foram manipulados de acordo com as instruções dos fabricantes com a adição dos fluoróforos aos cimentos no momento da manipulação na concentração de 0,1% (g/g); tal associação foi possível por apresentarem comprimentos de onda de excitação e emissão diferentes, em espectros de luz distintos.

Tão logo misturados os fluoróforos aos cimentos e já com os cones de gutapercha devidamente provados, os cimentos foram levados ao interior dos condutos com auxílio de espiral Lentulo nº 25 (Dentsply/Sirona) mantendo o instrumento 2,0 mm aquém do comprimento de trabalho. Em seguida, foi realizada a inserção dos cones, corte do excesso cervical com cureta aquecida e condensação vertical com compactadores de Paiva nº 3 (Fava, São Paulo, SP, Brasil).

Concluída a obturação dos canais, o selamento das embocaduras foi realizado com Cimento de Ionômero de Vidro (Maxxion R; FGM Produtos Odontológicos Ltda., Joinville, SC, Brasil) para em seguida os espécimes serem levados à estufa onde permaneceram por 7 dias a 37°C e 100% de umidade.

Análise dos espécimes com Microscópio Confocal a Laser

Decorrido o período de armazenamento, os dentes foram seccionados a 2 (apical), 4 (médio) e 6 mm (cervical) do ápice radicular, utilizando disco diamantado de 0,3 mm acionado na máquina de corte a 200 RPM, sob irrigação contínua com água. Em seguida, os discos de dentina produzidos foram polidos em máquina para polimento (Aropol 2V; Arotec, Cotia, SP, Brasil), sendo utilizadas lixas d'água de granulometria 600, 900 e 1200. Por fim, a face coronal de cada disco/espécime foi adaptada e fixada em lamínulas de vidro, numeradas e identificadas.

A interface cimento/dentina foi analisada no Microscópio Confocal de Varredura a Laser (LM 710; Carl Zeiss Microscopy GmbH, Baden-Württemberg, Alemanha), em modo de fluorescência. As secções foram visualizadas 10µm abaixo da superfície da amostra com aumento de 10x. As imagens foram obtidas pela varredura de 10 secções de 1 µm e gravadas em uma resolução de 1024 x 1024 pixels, utilizando o programa ZEN Imaging Software (Carl Zeiss Microscopy GmbH), e salvas em formato TIFF; foram

captadas imagens separadas para os dois fluoróforos, para isso o Laser foi emitido separadamente em cada um dos comprimentos de onda de excitação.

Para mensurar a profundidade de penetração dos cimentos endodônticos nos túbulos dentinários, as imagens foram avaliadas no programa Image J (National Institute of Health, Bethesda, EUA). A escala oferecida pelas imagens de microscopia confocal (100 μm) foi empregada na calibração do programa de medição, que forneceu os dados em milímetros. Durante as mensurações, linhas verticais e horizontais foram demarcadas para que as imagens tivessem 4 seguimentos de tamanhos iguais (Bitter *et al.*, 2004, Gharib *et al.*, 2007). A parede do canal serviu como ponto de partida e a penetração do cimento nos túbulos dentinários foi medida em sua maior extensão em cada segmento, sendo realizada apenas uma medida por segmento. A Figura 1 descreve o método empregado. Uma vez obtidas essas medições, foram calculadas as médias de profundidade de penetração de cada cimento nos túbulos dentinários sendo considerados como valor representativo do espécime.

Análise estatística

Os dados expressos em forma de média e desvio-padrão (dados paramétricos) foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk, e analisados pelos testes *t* de Student, ANOVA e ANOVA a 4 fatores seguidos do pós-teste de Bonferroni, utilizando-se um nível de significância de 5%.

RESULTADOS

A Figura 2 apresenta imagens ilustrativas da penetração oferecida pelos materiais nas duas condições em teste. A análise descritiva dos resultados da penetração intratubular oferecidos pelos cimentos, em função das variáveis umidade, fluoróforo e terço, encontra-se descrita na Tabela 1. Nesta também se encontra a estatística analítica com as comparações individuais entre os grupos. Considerando a comparação entre os fluoróforos ROD e o F3, foram observadas diferenças significantes nos terços apical, médio e cervical no grupo EF/UM, nos terços médio e cervical no grupo EF/SE e no terço cervical no grupo AH/UM ($P < 0,05$).

Considerando cada condição de umidade, diferenças significantes foram observadas em algumas comparações: na presença de umidade entre os cimentos no terço cervical ($P < 0,05$) com ambos os fluoróforos e no terço médio com a ROD ($P < 0,05$) e nos canais secos entre os cimentos nos terços apical ($P < 0,05$), médio ($P < 0,05$) e cervical

($P < 0,05$) com a ROD. Não foram observadas diferenças quando comparado cada fluoróforo nas duas condições considerando ambos os cimentos ($P > 0,05$). Por fim, considerando a comparação entre os terços de um mesmo cimento com os diferentes fluoróforos, encontrou-se diferença entre os terços cervical e médio quando comparados ao apical no cimento EF/SEC, empregando o F3 como fluoróforo ($P < 0,05$).

A Tabela 2 apresenta a análise estatística multifatorial, onde se constatou que o cimento AH Plus apresentou maior penetração quando comparado ao Endofill ($P < 0,05$). Não foram observadas diferenças significantes quando considerados os substratos (úmido e seco) ou o fluoróforo utilizado (Rodamina-B e Fluo-3) ($P > 0,05$). Quanto aos terços, a análise demonstrou que houve maior penetração dos cimentos nos terços médio e cervical quando comparados ao terço apical ($P < 0,05$).

DISCUSSÃO

O presente estudo buscou avaliar a penetração intratubular dos cimentos obturadores endodônticos AH Plus e Endofill em condição de umidade convencional e com canais secos; ainda, verificou se o emprego de diferentes fluoróforos, Rodamina-B ou Fluo-3, influenciariam em tal resultado, determinação até o presente inexistente na literatura. Para tal empregou-se a Microscopia Confocal de Varredura a Laser, método que utiliza uma combinação de microscopia óptica e recursos computacionais para aquisição e processamento de imagens (Chauhan *et al.*, 2012). Esse método apresenta como uma de suas principais vantagens o fato de não exigir preparos especiais das amostras quando comparada à microscopia eletrônica de varredura (MEV) (van Meerbeek *et al.*, 2000) e permitir análise das amostras em três dimensões (3D), possibilitando determinações da penetração intratubular mais precisas quando comparada ao MEV (Bitter *et al.*, 2009).

Para a visualização da penetração do cimento nos túbulos dentinários, faz-se necessária a utilização de um corante. A Rodamina-B é o corante mais utilizado na literatura (Gharib *et al.*, 2007, Ordiola-Zapata *et al.*, 2009, Silva *et al.*, 2015, Tedesco *et al.*, 2018). Todavia, não existem estudos que comparem a Rodamina-B com outro fluoróforo ou que comprovem que realmente é o cimento corado que penetra no túbulo e não parte deste que por ventura poderia se desprender e migrar em profundidade, uma vez que apresenta uma forte afinidade com umidade (Pioch *et al.*, 1997). Como resultado, poderia vir a se separar da mistura do cimento, marcar até pequenos graus de umidade na dentina, emitir fluorescência independente do cimento e mostrar uma penetração mais

profunda nos túbulos dentinários, resultando em achados imprecisos (Jeong *et al.*, 2017). Como opção ao seu emprego, foi sugerida a utilização do Fluo-3, que é um fluoróforo que na presença de íons de cálcio aumenta a intensidade da sua fluorescência em mais de 100 vezes, bem como na sua ausência não produz fluorescência no MCON (Paredes *et al.*, 2008).

Entretanto, apesar das vantagens e desvantagens atribuídas a cada um dos fluoróforos testados, em função dos resultados encontrados no presente estudo, mesmo considerando a existência de diferenças significantes em uma ou outra comparação testada, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os mesmos na análise multifatorial. Tal achado valida o emprego tanto da Rodamina-B quanto do Fluo-3 como marcadores da penetração intratubular em MCON dos cimentos endodônticos testados. Não se pode afastar a possibilidade de variações poderem vir a surgir quando do emprego de materiais obturadores com outras composições, fato que pode ensejar novas observações.

O escoamento, uma das propriedades físico-químicas apontadas como necessárias a um material obturador, é definido como a capacidade de um cimento de escoar em irregularidades, canais laterais e túbulos dentinários. Vários estudos demonstraram que a fluidez do AH Plus é superior à de os outros cimentos, notadamente o Endofill, Endobtur, Acroseal e Kentac Endo (Kokkas *et al.*, 2004, Bernardes *et al.*, 2010, Balguerie *et al.*, 2011). Cimentos à base de óxido de zinco e eugenol, como o Endofill, apresentam uma baixa coesão entre suas partículas e baixa resistência adesiva à dentina radicular, o que pode facilitar a ocorrência de falhas e dificultar sua penetração nos túbulos (De Oliveira *et al.*, 2003, Tedesco *et al.*, 2014). Os resultados do presente estudo, ressaltados pela diferença significativa observada, corroboram com a literatura ao apontar a superioridade do AH Plus quanto à penetração intratubular frente ao Endofill (Tedesco *et al.*, 2018). Sabidamente os cimentos à base de resinas plásticas exibem maior penetração do que os cimentos endodônticos convencionais – à base de óxido de zinco e eugenol (Kokkas *et al.*, 2004, Patel *et al.*, 2007, Gharib *et al.*, 2007). Todavia, até o presente, não existia informação da penetração em canais secos ou empregando o Fluo-3 como fluoróforo. Segundo Saleh *et al.* (2004), a boa penetração intratubular apresentará dois efeitos benéficos, o primeiro na vedação do SCR proveniente do aumento do contato de superfície entre o cimento e os túbulos dentinários e o segundo um efeito antimicrobiano, devido ao sepultamento das bactérias residuais nos túbulos dentinários.

A penetração nos túbulos dentinários foi significativamente maior nos terços cervical e médio quando comparado ao terço apical. Esse achado corrobora com vários autores que apontam como justificativas o fato de o terço apical apresentar menor número de túbulos, os quais, quando presentes, apresentam-se em menor diâmetro ou até mesmo obliterados (Balguerie *et al.*, 2011, Kara *et al.*, 2012, Chadha *et al.*, 2012). Ainda, apresentam grande variação na anatomia nessa região do canal radicular em termos de trajetória (Mjör *et al.*, 2001).

Considerando os achados do presente estudo, é importante ressaltar que, apesar de ter sido introduzido o Fluo-3 como opção à Rodamina-B, como marcador fluorescente para emprego em MCON, os resultados observados apontam para a validade dos resultados presentes na literatura quando do emprego da Rodamina-B, mesmo diante de extremos de umidade no SCR. Quanto aos materiais testados, confirma-se a informação preexistente da superioridade do AH Plus frente ao cimento Endofill quanto à penetração nos túbulos dentinários, fato que pode incrementar os índices de sucesso do tratamento por proporcionar maior aprisionamento das bactérias remanescentes ao tratamento.

CONCLUSÃO

Em função dos resultados pode-se concluir que a profundidade de penetração tubular proporcionada pelo AH Plus foi superior à do Endofill, e que não foram observadas diferenças em relação ao fluoróforo em função da condição de umidade dos canais, validando, desta forma, tanto a Rodamina-B quanto o Fluo-3 como fluoróforos em microscopia confocal; ainda, que as maiores penetrações foram observadas nos terços cervical e médio.

REFERÊNCIAS

01. Sjögren U, Figdor D, Persson S, Sundqvist G. (1997) Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *International Endodontic Journal* **30**, 297-306.
02. Silva RV, Silveira FF, Horta MCR, Duarte MAH, Cavenago BC, de Moraes IG, et al. (2015) Filling effectiveness and dentinal penetration of endodontic sealers:

- a stereo and confocal laser scanning microscopy study. *Brazilian Dental Journal* **26**(5), 541-546.
03. Ma J, Wang Z, Shen Y, Haapasalo M. (2011) A new noninvasive model to study the effectiveness of dentin disinfection by using confocal laser scanning microscopy. *Journal of Endodontics* **37**, 1380-1385.
04. Jeong JW, DeGraft-Johnson A, Dorn SO, Di Fiore PM. (2017) Dentinal Tubule Penetration of a Calcium Silicate-based Root Canal Sealer with Different Obturation Methods. *Journal of Endodontics* **43**, 633-637.
05. Piazza B, Rivera-Peña ME, Alcade MP, Vasconcelos BC, Duarte MAH, Moraes IG, Vivan RR. (2018) The influence of Humidity on Intra-tubular penetration and bond strength of AH Plus and MTA Fillapex: An in vitro study. *European Endodontic Journal* **3**, 48-54.
06. Huang Y, Orhan K, Celikten B, Orhan AI, Tufenkci P, Sevimay S. (2018) Evaluation of the sealing ability of different root canal sealers: a combined SEM and micro-CT study. *Journal of Applied Oral Science* **26**, e20160584.
07. Ordinola-Zapata R, Bramante CM, Graeff MS, del Carpio Perochena A, Vivan RR, Camargo EJ, Garcia RB, Bernardineli N, Gutmann JL, de Moraes IG. (2009) Depth and percentage of penetration of endodontic sealers into dentinal tubules after root canal obturation using a lateral compactation technique: a confocal scanning microscopy study. *Oral Surgery Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology Endodontology* **108**, 450-457.
08. Guimarães BM, Amoroso-Silva P, Alcalde MP, Marciano MA, Bombarda FA, Duarte MAH. (2014) Influence of ultrasonic activation of 4 root canal sealer on filling quality. *Journal of Endodontics* **40**, 964-968.
09. Marciano MA, Guimarães BM, Ordinola-Zapata R, Bramante CM, Cavenago BC, Garcia RB, Bernardineli N, Andrade FB, Moraes IG, Duarte MA. (2011a) Physical properties and interfacial adaptation of three epoxy resin-based sealers. *Journal of Endodontics* **37**, 1417-1421.
10. Marciano MA, Ordinola-Zapata R, Cunha TV, Duarte MA, Cavenago BC, Garcia RB, Bramante CM, Bernardineli N, Moraes IG. (2011b) Analysis of four gutta-percha techniques used to fill mesial root canals of mandibular molars. *International Endodontic Journal* **44**, 321-329.

11. Chandra SS, Shankar P, Indira R. (2012) Depth of penetration of four resin sealers into radicular dentinal tubules: a confocal microscopic study. *Journal of Endodontics* **38**, 1412-1416.
12. Minta A, Kao JP, Tsien RY. (1989) Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophores. *Journal of Biological Chemistry*. May 15; **264**, 8171-8178.
13. Bootman M, Niggli E, Berridge M, Lipp P. (1997) Imaging the hierarchical Ca²⁺ signalling system in HeLa cells. *The Journal of Physiology* Mar 1; **499** (Pt 2), 307-314.
14. Wang Y, Liu S, Dong Y. (2018) In vitro study of dentinal tubule penetration and filling quality of bioceramic sealer. *PLoS ONE* **13**(2): e0192248.
15. Khedmat S, Momen-Heravi F, Pishvaei M. (2013) A comparison of viscoelastic properties of three root canal sealers. *Journal of Dentistry of Tehran University of Medical Sciences* **10**, 147-154.
16. De Oliveira Mendes ST, Ribeiro Sobrinho AP, de Carvalho AT, et al. (2003) In vitro evaluation of the cytotoxicity of two root canal sealers on macrophage activity. *Journal of Endodontic* **29**, 95-99.
17. Cheng H, Lederer MR, Lederer WJ, Cannell MB. (1996) Calcium sparks and [Ca²⁺] waves in cardiac myocytes. *American Journal of Physiology* **270**, C148-159.
18. Tedesco M, Chain MC, Bortoluzzi EA, Garcia LFR, Alves AMH, Teixeira CS. (2018) Comparison of two observational methods, scanning electron and confocal laser scanning microscopies, in the adhesive interface analysis of endodontic sealers to root dentine. *Clinical Oral Investigations* **22**, 2353-2361.
19. Silva RV, Silveira FF, Horta MCR, Duarte MAH, Cavenago BC, Morais IG, Nunes E. (2015) Filling Effectiveness and Dentinal Penetration of Endodontic Sealers: A Stereo and Confocal Laser Scanning Microscopy Study. *Brazilian Dental Journal* **26**, 541-546.
20. Balguerie E, van der Luis L, Vallaeys K, Gurgel-Georgelin M, Diemer F. (2011) Sealer Penetration and Adaptation in the Dentinal Tubules: A Scanning Electron Microscopic Study. *Journal of Endodontic* **37**, 1576-1579.

21. van der Sluis L, Shemesh H, Wu M, Wesselink P. (2007) An evaluation of the influence of passive ultrasonic irrigation on the seal of root canal fillings. *International Endodontic Journal* **40**, 356-361.
22. Chauhan R, Tikku A, Chandra A. (2012) Detection of residual obturation material after root canal retreatment with three different techniques using a dental operating microscope and stereomicroscope: An in vitro comparative evaluation. *Journal of Conservative Dentistry* **15**, 218-222.
23. van Meerbeek B, Vargas M, Inoue S, et al. (2000) Microscopy investigations. Techniques, results, limitations. *American Journal of Dentistry* **13**, 3-18.
24. Bitter K, Paris S, Mueller J, Neumann K, Kielbassa AM. (2009) Correlation of scanning electron and confocal laser scanning microscopic analyses for visualization of dentin/adhesive interfaces in the root canal. *The Journal of Adhesive Dentistry* **11**, 7-14.
25. Patel DV, Sherriff M, Ford TRP, Watson TF, Mannocci F. (2007) The penetration of Real Seal primer and Tubliseal into root canal dentinal tubules: a confocal microscopic study. *International Endodontic Journal* **40**, 67-71.
26. Gharib SR, Tordik PA, Imamura GM, Baginski TA, Goodell GG. (2007) A confocal laser scanning microscope investigation of the epiphany obturation system. *Journal of Endodontic* **33**, 957-961.
27. Pioch T, Stotz S, Staehle HJ, Duschner H. (1997) Applications of confocal laser scanning microscopy to dental bonding. *Advances in Dental Research* **11**:453-461.
28. Paredes RM, Etzler JC, Watts LT, et al. (2008) Chemical calcium indicators. *Methods* **46**, 143-151.
29. Candeiro GT, Correia FC, Duarte MA, Ribeiro-Siqueira DC, Gavini G. (2012) Evaluation of radiopacity, pH, release of calcium ions, and flow of a bioceramic root canal sealer. *Journal of Endodontic* **38**, 842-845.
30. Kokkas A, Boutsoukis A, Vassiliadis L, Stavrianos CK. (2004) The influence of the smear layer on dentinal tubule penetration depth by three different root canal sealers: an in vitro study. *Journal of Endodontic* **30**, 100-102.
31. Tedesco M, Felipe MC, Felipe WT, Alves AM, Bortoluzzi EA, Teixeira CS. (2014) Adhesive interface and bond strength of endodontic sealers to root canal

- dentine after immersion in phosphate-buffered saline. *Microscopy Research Technique* **77**, 1015-1022.
32. Saleh IM, Ruyter IE, Haapasalo M, Ørstavik D. (2004) Survival of *Enterococcus faecalis* in infected dentinal tubules after root canal filling with different root canal sealers in vitro. *International Endodontic Journal* **37**,193-198.
33. Kara Tuncer A, Tuncer S. (2012) Effect of different final irrigation solutions on dentinal tu- bule penetration depth and percentage of root canal sealer. *Journal of Endodontic* **38**, 860-863.
34. Chadha R, Taneja S, Kumar M, Gupta S. (2012) An in vitro comparative evaluation of depth of tubular penetration of three resin-based root canal sealers. *Journal of Conservative Dentistry* **15**,18-21.
35. Kuçi A, Alaçam T, Yavaş O, Ergul-Ulger Z, Kayaoglu G. (2014) Sealer Penetration into Dentinal Tubules in the Presence or Absence of Smear Layer: A Confocal Laser Scanning Microscopic Study. *Journal of Endodontic* **40**,1627-1631.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Paulo Goberlândio pela realização das análises estatísticas. A Central Analítica-UFC/CT-INFRA/MCTI-SISNANO/Pró-Equipamentos CAPES por viabilizar as análises em microscopia. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES). Os autores negam quaisquer conflitos de interesse relacionados a este estudo.

FIGURAS E TABELAS

Tabela 1. Resultados (mm) oferecidos pelos grupos em teste em função dos cimentos, fluoróforo e condição de umidade considerando os três terços analisados.

Fluoróforo	Endofill			p-Valor ^e	AH Plus			p-Valor ^e	Endofill vs. AH Plus (p-Valor ^b)		
	Apical	Médio	Cervical		Apical	Médio	Cervical		Apical	Médio	Cervical
Úmido											
Rodamina	0,012±0,012	0,085±0,173	0,081±0,080	0,522	0,225±0,211	0,480±0,349	0,585±0,197	0,080	0,054	0,032	0,001
F3	0,279±0,166	0,424±0,203	0,407±0,097	0,334	0,123±0,147	0,226±0,141	0,256±0,112	0,232	0,132	0,079	0,041
p-Valor^a	0,007	0,011	<0,001		0,358	0,129	0,005				
Seco											
Rodamina	0,031±0,027	0,069±0,115	0,042±0,051	0,667	0,411±0,274	0,562±0,452	0,681±0,246	0,585	0,007	0,029	0,001
F3	0,153±0,160	0,420±0,126	0,538±0,378	0,055	0,306±0,249	0,354±0,254	0,413±0,205	0,738	0,233	0,617	0,492
p-Valor^a	0,123	0,001	0,010		0,502	0,394	0,132				
p-Valor^c	0,193	0,855	0,332		0,217	0,739	0,906				
p-Valor^d	0,231	0,973	0,472		0,152	0,316	0,132				

^aTeste t de Student (Rodamina versus F3); ^bTeste t de Student (Endofill versus AH Plus); ^cTeste t de Student (Seco versus Úmido) no grupo Rodamina; ^dTeste t de Student (Seco versus Úmido) no grupo F3; ^eTeste ANOVA/Bonferroni (Apical versus Médio versus Cervical), *p<0,05 versus Apical. Dados expressos em forma de média e desvio-padrão.

Tabela 2. Análise multifatorial da penetração dos cimentos endodônticos nos túbulos, verificação da interação entre as variáveis.

Fatores	gL	F	p-Valor	Pós-teste
Interação	5	273,417	<0,001	
Grupo*Umidade*Fluoróforo*Terço				
Grupo	1	21,799	<0,001	AH Plus > Endofill
Umidade	1	2,786	0,098	Úmido = Seco
Fluoróforo	1	2,785	0,098	Rodamida = F3
Terço	2	8,680	<0,001	Apical < Médio = Cervical

*p<0,05, teste ANOVA-4-fatores; F = Estatística ANOVA; gL = graus de liberdade; Pós-teste = Bonferroni.

FIGURAS E LEGENDAS

Figura 01. a. Áreas observadas e analisadas quanto à penetração intratubular dos cimentos endodônticos em cada área; b. T - tags, C/GP - cimento e guta-percha, D – Dentina.

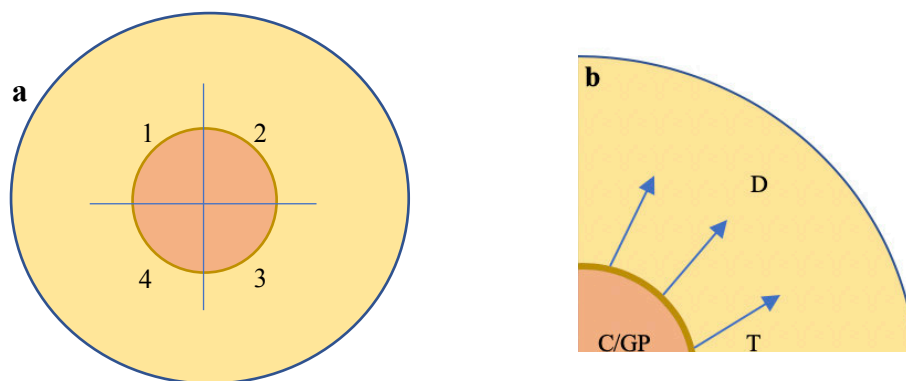
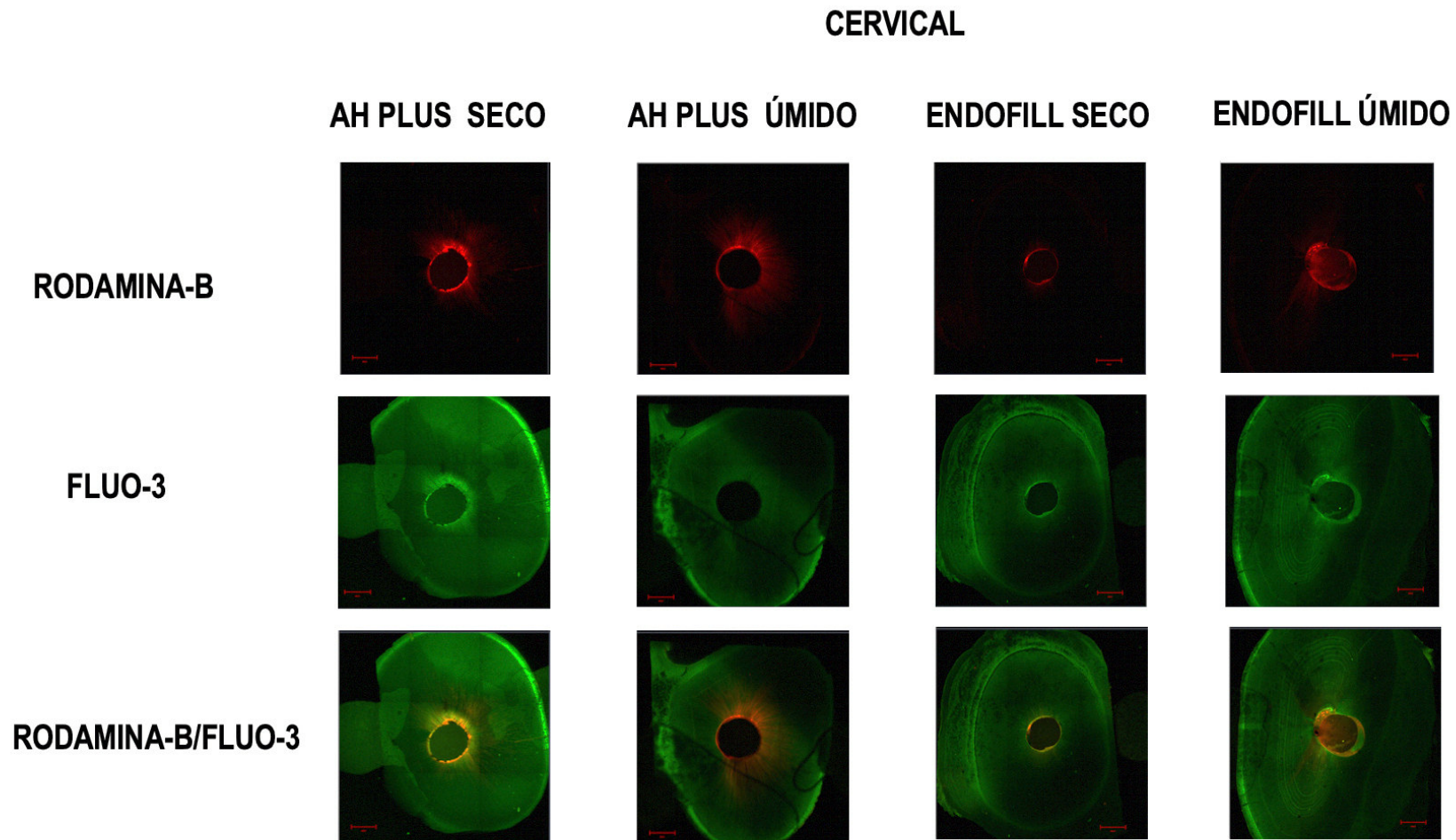


Figura 02. Imagens ilustrativas da penetração oferecida pelos materiais nas duas condições em teste.



5. CONCLUSÃO GERAL

Em função dos métodos aplicados e considerando os resultados deste estudo pode-se concluir que:

- O cimento resinoso AH Plus apresentou maior penetração intratubular quando comparado ao cimento Endofill, independente de outras variáveis testadas;
- Os diferentes padrões de umidade testados não influenciaram nos resultados de penetração intratubular dos cimentos obturadores avaliados;
- Não foram observadas diferenças significantes entre os fluoróforos, Rodamina-B e Fluo-3, independente da condição de umidade do sistema de canais radiculares;
- Houve diferença estatisticamente significativa em relação a penetração dos cimentos quando analisado os terços, sendo maior a penetração nos terços cervical e médio quando comparado ao terço apical.

REFERÊNCIAS

- AVERBACH R E, KLEIER DJ. Clinical update on root canal disinfection. **Compendium of Continuous Education in Dentistry**, v. 27, p. 284, 286–289, 2006.
- BALGUERIE E, VAN DER LUIS L, VALLAEYS K, GURGEL-GEORGELIN M, DIEMER F. Sealer Penetration and Adaptation in the Dentinal Tubules: A Scanning Electron Microscopic Study. **Journal of Endodontics**, v. 37, p. 1576–1579, 2011.
- BOOTMAN M, NIGGLI E, BERRIDGE M, LIPP P. Imaging the hierarchical Ca²⁺ signalling system in HeLa cells. **The Journal of Physiology**, Mar 1; 499 (Pt 2), p. 307-314, 1997.
- BÜRKLEIN S, HINSCHITZA K, DAMMASCHKE T, SCHAFER E. Shaping ability and cleaning effectiveness of two single-file systems in severely curved root canals of extracted teeth: Reciproc and WaveOne versus Mtwo and ProTaper. **International Endodontic Journal**, v. 45, n. 5, p. 449-461, 2012.
- BÜRKLEIN S, BENTEN S, SCHÄFER 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. 405-409, 2014.
- CAMILLERI J. Sealers and warm gutta-percha obturation techniques. **Journal of Endodontics**, v. 41, n. 1, p. 72–78, 2015.
- CHANDRA SS, SHANKAR P, INDIRA R. Depth of penetration of four resin sealers into radicular dentinal tubules: a confocal microscopic study. **Journal of Endodontics**, v. 38, n. 10, p. 1412-1416, 2012.
- CHATTON JY, CAO Y, STUCKI JW. Perturbation of myo-inositol-1,4,5-trisphosphate levels during agonist-induced Ca²⁺ oscillations. **Biophysical Journal**, Jan; v. 74, n. 1, p. 523-531, 1998.
- CHEN H, ZHAO X, QIU Y, XU D, CUI L, BULING WU B. The Tubular Penetration Depth and Adaption of Four Sealers: A Scanning Electron Microscopic Study. **BioMed Research International**, 8 pags, 2017.
- DE DEUS G, MARTINS F, LIMA A, GURGEL-FILHO ED, MANIGLIA-FERREIRA C, COUTINHO-FILHO T. Analysis of the film thickness of a root sealer following three obturation techniques. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, v.17, n. 2, p. 119-125, 2003.
- DE DEUS GA, GURGEL-FILHO ED, MANIGLIA-FERREIRA C, COUTINHO-FILHO T. The influence of filling technique on depth of tubule penetration by root canal sealer: a study using light microscopy and digital image processing. **Australian Endodontic Journal**, v. 30, n. 1, p. 23-28, 2004.
- DE-DEUS G, BRANDÃO MC, LEAL F, REIS C, SOUZA EM, LUNA AS, PACIORNIK S, FIDEL S. Lack of correlation between sealer penetration into dentinal tubules and sealability in nonbonded root fillings. **International Endodontic Journal**, v. 45, n. 7, p. 642-651, 2012.

DE OLIVEIRA MST, RIBEIRO SOBRINHO AP, DE CARVALHO AT. In vitro evaluation of the cytotoxicity of two root canal sealers on macrophage activity. **Journal of Endodontics**, v. 29, p. 95–99, 2003.

GHARIB SR, TORDIK PA, IMAMURA GM, BAGINSKI TA, GOODELL GG. A confocal laser scanning microscope investigation of the epiphany obturation system. **Journal of Endodontics** v. 33, p. 957-961, 2007.

GORDON MP, LOVE RM, CHANDLER NP. An evaluation of .06 tapered gutta-percha cones for filling of .06 taper prepared curved root canals. **International Endodontic Journal**, v. 38, n. 2, p. 87-96, 2005.

GOUND T, RIEHM R, MAKKAWY H, ODGGARD E. A description of an alternative method of lateral condensation and a comparison of the ability to obturate canals using mechanical or traditional lateral condensation. **Journal of Endodontics**, v. 26, n. 12, p. 756-759, 2000.

GUIMARÃES BM, AMOROSO-SILVA P, ALCALDE MP, MARCIANO MA, BOMBARDA FA, DUARTE MAH. Influence of ultrasonic activation of 4 root canal sealer on filling quality. **Journal of Endodontics**, v. 40, n. 7, p. 964-968, 2014.

HÜLSMANN M, PETERS OA, DUMMER P MH. Mechanical preparation of root canals: shaping goals, techniques and means. **Endodontic Topics**, v. 10, p. 30–76, 2005.

HULSMANN M, GRESSMANN G, SCHAFERS F. A comparative study of root canal preparation using FlexMaster and HERO 642 rotary Ni-Ti instruments. **International Endodontic Journal**, v. 36, p. 358–366, 2003.

JEONG JW, DEGRAFT-JOHNSON A, DORN SO, DI FIORI PM. Dentinal Tubule Penetration of a Calcium Silicate-based Root Canal Sealer with Different Obturation Methods. **Journal of Endodontics**, v. 43, p. 633–637, 2017.

JUNE CH, RABINOVITCH PS. Intracellular ionized calcium. **Methods in Cell Biology**, v. 4, p. 149-174, 1994.

KIM YK, GRANDINI S, AMES JM, GU LS, KIM SK, PASHLEY DH, GUTMANN JL, TAY FR. Critical review on methacrylate resin-based root canal sealers. **Journal of Endodontics**, v. 36, n. 3, p. 383–399, 2010.

KIM HC, KWAK SW, CHEUNG GS, KO DH, CHUNG SM, LEE W. Cyclic fatigue and torsional resistance of two new nickel-titanium instruments used in reciprocation motion: Reciproc versus WaveOne. **Journal of Endodontics**, v. 38, n. 4, p. 541-544, 2012.

KOKKAS AB, BOUTSIOUKIS A, VASSILIADIS LP, STAVRIANOS CK. The influence of the smear layer on dentinal tubule penetration depth by three different root canal sealers: an in vitro study. **Journal of Endodontics**, v. 30, p. 100-102, 2004.

KUÇI A, ALAÇAM T, YAVAS O, ERGUL-ULGER ZM, KAYAOGLU G. Sealer Penetration into Dentinal Tubules in the Presence or Absence of Smear Layer: A Confocal Laser Scanning Microscopic Study. **Journal of Endodontics**, v. 40, p. 1627–1631, 2014.

LI GH, NIU LN, ZHANG W, OLSEN M, DE-DEUS G, EID AA, CHEN JH, PASHLEY DH, TAY FR. Ability of new obturation materials to improve the seal of the root canal system: a review. **Acta Biomaterialia**, v. 10, n. 3, p. 1050-1063, 2014.

MARCIANO MA, GUIMARÃES BM, ORDINOLA-ZAPATA R, BRAMANTE CM, CAVENAGO BC, GARCIA RB, BERNADINELI N, ANDRADE FB, MORAES IG, DUARTE MAH. Physical properties and interfacial adaptation of three epoxy resin-based sealers. **Journal of Endodontics**, v. 37, n. 10, p. 1417–1421, 2011a.

MARCIANO MA, ORDINOLA-ZAPATA R, CUNHA TV, DUARTE MA, CAVENAGO BC, GARCIA RB, BERNADINELI N, ANDRADE FB, MORAES IG. Analysis of four gutta-percha techniques used to fill mesial root canals of mandibular molars. **International Endodontic Journal**, v. 44, n. 4, p. 321-329, 2011b.

MAMOOTIL K.; MESSER H. H. Penetration of dentinal tubules by endodontic sealer cements in extracted teeth and in vivo. **International Endodontic Journal**, v. 40, p. 873–881, 2007.

MULIYAR S, SHAMEEM KS, THANKACHAN RP, FRANCIS PG, JAYAPALAN CS, HAFIZ KA. Microleakage in endodontics. **Journal of International Oral Health**, p. 99–104, 2014.

NAGAS E, ALTUNDASAR E, SERPER A. The effect of master point taper on bond strength and apical sealing ability of different root canal sealers. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 107, n. 1, p. 61-64, 2009.

ORDINOLA-ZAPATA R, BRAMANTE CM, GRAEFF MS, DELCARPIOPEROCHENA A, VIVAN RR, CAMARGO EJ, GARCIA RB, BERNARDINELI N, GUTMANN JL, DE MORAES IG. Depth and percentage of penetration of endodontic sealers into dentinal tubules after root canal obturation using a lateral compaction technique: a confocal laser scanning microscopy study. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 108, n. 3, p. 450-457, 2009.

PAQUE F, GANAHL D, PETERS O A. Effects of root canal preparation on apical geometry assessed by micro-computed tomography. **Journal of Endodontics**, v. 35, p. 1056–1059, 2009.

PATEL DV, SHERRIFF M, FORD TR, WATSON TF, MANNOCCI F. The penetration of RealSeal primer and Tubliseal into root canal dentinal tubules: a confocal microscopic study. **International Endodontic Journal**, v. 40, p. 67-71, 2007.

PEDULLA E, GRANDE NM, PLOTINO G, GAMBARINI G, RAPISARDA E. Influence of Continuous or Reciprocating Motion on Cyclic Fatigue Resistance of 4 Different Nickel-Titanium Rotary Instruments. **Journal of Endodontics**, v. 39, n. 2, 2013.

- PEREIRA RD, BRITO-JÚNIOR M, LEONI GB, ESTRELA C, DE SOUSA-NETO MD. Evaluation of bond strength in single-cone fillings of canals with different cross-sections. **International Endodontic Journal**, v.50, p. 177–183, 2017.
- PETERS LB, WESSELINK PR. Periapical healing of endodontically treated teeth in one and two visits obturated in the presence or absence of detectable microorganisms. **International Endodontic Journal**, v. 35, p. 660–667, 2002.
- PIOCH T, STOTZ S, STAEHLE HJ, DUSCHNER H. Applications of confocal laser scanning microscopy to dental bonding. **Advances in Dental Research**, v. 11, p. 453–461, 1997.
- RESENDE LM, RACHED-JUNIOR FJ, VERSIANI MA, SOUSA-GABRIEL AE, MIRANDA CE, SILVA-SOUSA YT, SOUSA-NETO MD. A comparative study of physicochemical properties of AH Plus, Epiphany, and Epiphany SE root canal sealers. **International Endodontic Journal**, v. 42, n. 9, p. 785-793, 2009.
- ROMANIA C, BELTS P, BOUTSIUKIS C, DANDAKIS C. Ex-vivo area-metric analysis of root canal obturation using gutta-percha cones of different taper. **International Endodontic Journal**, v. 42, n. 6, p. 491-498, 2009.
- SALEH IM, RUYTER IE, HAAPASALO MP, ORSTAVIK D. Adhesion of endodontic sealers: scanning electron microscopy and energy dispersive spectroscopy. **Journal of Endodontics**, v. 29, n. 9, p. 595-601, 2003.
- SCHÄFER E, NELIUS B, BÜRKLEIN S. A comparative evaluation of gutta-percha filled areas in curved root canals obturated with different techniques. **Clinical Oral Investigations**, v. 16, n. 1, p. 225-230, 2012.
- SHEN Y, ZHOU HM, ZHENG YF, PENG B, HAAPASALO M. Current challenges and concepts of the thermomechanical treatment of nickel-titanium instruments. **Journal of Endodontics**, v.39, n. 2, p. 163-172, 2013.
- SIQUEIRA JR JF, RÔÇAS IN. Clinical Implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. **Journal of Endodontics**, v. 34, n. 11, p. 1291-1301, 2008.
- SIQUEIRA JR JF, RÔÇAS IN, LOPES HP, MOREIRA EJ. Materiais obturadores In: Lopes HP, Siqueira JF Jr. Endodontia – Biologia e técnica. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 613-639, 2010.
- SILVEIRA CM, PINTO SC, ZEDEBSKI RDE, SANTOS FA, PILATTI GL. Biocompatibility of four root canal sealers: a histopathological evaluation in rat subcutaneous connective tissue. **Brazilian Dental Journal**, v. 22, n. 1, p. 21-27, 2011.
- TEDESCO M, FELIPPE MC, FELIPPE WT, ALVES AM, BORTOLUZZI EA, TEIXEIRA CS. Adhesive interface and bond strength of endodontic sealers to root canal dentine after immersion in phosphate- buffered saline. **Microscopy Research and Technique**, v. 77, n. 12, p. 1015–1022, 2014.

TEDESCO M, CHAIN MC, BORTOLUZZI EA, GARCIA LFR, ALVES AM, TEIXEIRA CS. Comparison of two observational methods, scanning electron and confocal laser scanning microscopies, in the adhesive interface analysis of endodontic sealers to root dentine. **Clinical Oral Investigations**, v. 22, p. 2353–2361, 2018.

TOPÇUOĞLU HS, ARSLAN H, AKÇAY M, SAYGILI G, ÇAKICI F, TOPÇUOĞLU G. The effect of medicaments used in endodontic regeneration technique on the dislocation resistance of mineral trioxide aggregate to root canal dentin. **Journal of Endodontics**, v.40, n. 12, p. 2041–2044, 2014.

THOMAS D, TOVEY SC, COLLINS TJ, BOOTMAN MD, BERRIDGE MJ, LIPP P. **Cell Calcium**, v. 28, p. 213–223, 2000.

VENTURI, M. Evaluation of canal filling after using two warm vertical gutta-percha compaction techniques *in vivo*: a preliminary study. **International Endodontic Journal**, v. 39, p. 538-546, 2006.

VERSIANI MA, LEONI GB, STEIER L, DE-DEUS G, TASSANI S, PÉCORA JD, DE SOUSA-NETO MD. Micro-computed tomography study of oval-shaped canals prepared with the self-adjusting file, Reciproc, WaveOne, and ProTaper universal systems. **Journal of Endodontics**, v. 39, n.8, p. 1060-1066, 2013.

VERSIANI MA, CARVALHO-JUNIOR JR, PADILHA MI, LACEY S, PASCON EA, SOUSA-NETO MD. A comparative study of physicochemical properties of AH Plus and Epiphany root canal sealants. **International Endodontic Journal**, v. 39, n. 6, p. 464-471, 2006.

VIAPIANA R, GUERREIRO-TANOMARU J, TANOMARU-FILHO M, CAMILLERI J. Interface of dentine to root canal sealers. **Journal of Dentistry**, v. 42, p. 336-350, 2014

VITTI RP, PRATIB C, SILVA EJM, SINHORETI MAC, ZANCHIC CH, SOUSA-SILVA MG. Physical properties of MTA Fillapex sealer. **Journal of Endodontics** 39:915–918, 2013.

WANG Y, LIU S, DONG Y. In vitro study of dentinal tubule penetration and filling quality of bioceramic sealer. **PLoS ONE**, v.13, n. 2, p. e0192248, 2018.

YOU SY, BAE KS, BAEK SH, KUM KY, SHON WJ, LEE W. Lifespan of one nickel-titanium rotary file with reciprocating motion in curved root canals. **Journal of Endodontics**, v. 36, p. 1991–1994, 2010.

ANEXO 1

UFC - UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ /



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Determinação da profundidade de penetração intratubular de dois cimentos obturadores endodônticos em função da umidade e do fluoróforo empregados

Pesquisador: AMANDA MOURAO LEY

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 97052618.0.0000.5054

Instituição Proponente: Departamento de Clínica Odontológica

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.888.556

Apresentação do Projeto:

O presente estudo tem por objetivo determinar a profundidade de penetração nos túbulos dentinários proporcionada por dois cimentos obturadores endodônticos em função da umidade presente no sistema de canais radiculares e do fluoróforo empregado. Os fluoróforos utilizados serão a Rodamina-B (ROD) e o Fluo-3 (F3) que serão misturados simultaneamente aos cimentos AH Plus (AH) e MTA Fillapex (MTAF) no momento da manipulação. Quarenta e oito molares superiores humanos terão suas raízes disto-vestibulares separadas das coroas (12 mm) e randomicamente divididas em 4 grupos (n = 12) em função do cimento (AH/MTAF) e da condição do substrato dentinário (úmido/seco). As mesmas serão preparadas e obturadas com instrumentos e cones de guta-percha do sistema Reciproc e será empregada a técnica do cone único. Para remoção da umidade as raízes serão mantidas em estufa à 70o C por 7 dias. As raízes que manterão substrato úmido serão secas unicamente com breve aspiração seguida de cones de papel absorvente. Decorridos 7 dias os espécimes serão seccionados transversalmente à 2, 4 e 6 mm do ápice anatômico; as secções serão levadas ao microscópio confocal de varredura à Laser e ao microscópio eletrônico de varredura para determinação da profundidade de penetração dos cimentos nos túbulos dentinários (mm). Em função da natureza dos dados, os resultados coletados serão submetidos à análise de variância e a teste de comparações individuais, ambos com nível de significância estabelecido em 5%. Palavras chaves: Endodontia, cimentos dentários, microscopia confocal, corantes fluorescentes.

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

Bairro: Rodolfo Teófilo

CEP: 60.430-275

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3366-8344

E-mail: comepe@ufc.br

UFC - UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ /



Continuação do Parecer: 2.888.556

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

1.1 Objetivo Geral Determinar a profundidade de penetração intratubular de dois cimentos obturadores endodônticos em função da umidade e do fluoróforo empregados.

Objetivo Secundário:

Objetivos Específicos- Observar, por meio da microscopia confocal à Laser (MCON), a profundidade de penetração alcançada pelos cimentos obturadores endodônticos AH Plus e MTA Fillapex em dentina úmida e seca, empregando a Rodamina-B e o Fluo-3 como fluoróforos;- Analisar, por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV), a profundidade de penetração dos cimentos em dentina úmida e seca;- Verificar a concordância dos resultados obtidos com os dois fluoróforos em função da umidade presente no substrato;- Comparar os resultados encontrados nas duas metodologias empregadas (MCON e MEV);- Determinar o fluoróforo ideal para avaliações da profundidade de penetração nos túbulos dentinários dos cimentos obturadores endodônticos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Benefícios: Verificar a penetrabilidade dos cimentos nos túbulos dentinários

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa importante na área da endodontia pois irá:

-Determinar o perímetro de penetração dos cimentos endodônticos nos túbulos dentinários. -Determinar o fluoróforo ideal para mensurar a real profundidade de penetração dos cimentos nos túbulos dentinários.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos foram entregues e assinados adequadamente inclusive o termo de doação de dentes humanos

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000	CEP: 60.430-275
Bairro: Rodolfo Teófilo	
UF: CE	Município: FORTALEZA
Telefone: (85)3366-8344	E-mail: comepe@ufc.br

UFC - UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ /



Continuação do Parecer: 2.888.556

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1014319.pdf	28/08/2018 19:47:04		Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	28/08/2018 19:46:28	AMANDA MOURAO LEY	Aceito
Outros	Termo_de_fiel_depositario.docx	28/08/2018 19:40:46	AMANDA MOURAO LEY	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	28/08/2018 19:39:18	AMANDA MOURAO LEY	Aceito
Outros	Carta_de_apreciacao.pdf	28/08/2018 19:37:46	AMANDA MOURAO LEY	Aceito
Orçamento	Orcamento.pdf	28/08/2018 19:36:12	AMANDA MOURAO LEY	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_de_concordancia.pdf	28/08/2018 19:35:13	AMANDA MOURAO LEY	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Autorizacao_institucional.pdf	28/08/2018 19:34:25	AMANDA MOURAO LEY	Aceito
Cronograma	Cronograma.pdf	28/08/2018 19:29:47	AMANDA MOURAO LEY	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.docx	28/08/2018 18:24:08	AMANDA MOURAO LEY	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Avaliação da CONEP:

Não

FORTALEZA, 12 de Setembro de 2018

Assinado por:
FERNANDO ANTONIO FROTA BEZERRA
(Coordenador)

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

Bairro: Rodolfo Teófilo

CEP: 60.430-275

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3366-8344

E-mail: comepe@ufc.br

ANEXO 2 – NORMAS DA REVISTA

INTERNATIONAL ENDODONTIC JOURNAL

Author Guidelines

5. MANUSCRIPT FORMAT AND STRUCTURE

5.1.Format

Language: The language of publication is English. It is preferred that manuscript is professionally edited. A list of independent suppliers of editing services can be found at http://authorservices.wiley.com/bauthor/english_language.asp. All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.

Presentation: Authors should pay special attention to the presentation of their research findings or clinical reports so that they may be communicated clearly. Technical jargon should be avoided as much as possible and clearly explained where its use is unavoidable. Abbreviations should also be kept to a minimum, particularly those that are not standard. The background and hypotheses underlying the study, as well as its main conclusions, should be clearly explained. Titles and abstracts especially should be written in language that will be readily intelligible to any scientist.

Abbreviations: International Endodontic Journal adheres to the conventions outlined in Units, Symbols and Abbreviations: A Guide for Medical and Scientific Editors and Authors. When non-standard terms appearing 3 or more times in the manuscript are to be abbreviated, they should be written out completely in the text when first used with the abbreviation in parenthesis.

5.2.Structure

All manuscripts submitted to *International Endodontic Journal* should include Title Page, Abstract, Main Text, References and Acknowledgements, Tables, Figures and Figure Legends as appropriate

Title Page: The title page should bear: (i) Title, which should be concise as well as descriptive; (ii) Initial(s) and last (family) name of each author; (iii) Name and address of department, hospital or institution to which work should be attributed; (iv) Running title (no more than 30 letters and spaces); (v) No more than six keywords (in alphabetical order); (vi) Name, full postal address, telephone, fax number and e-mail address of author responsible for correspondence.

Abstract for Original Scientific Articles should be no more than 350 words giving details of what was done using the following structure:

- **Aim:** Give a clear statement of the main aim of the study and the main hypothesis tested, if any.
- **Methodology:** Describe the methods adopted including, as appropriate, the design of the study, the setting, entry requirements for subjects, use of materials, outcome measures and statistical tests.
- **Results:** Give the main results of the study, including the outcome of any statistical analysis.
- **Conclusions:** State the primary conclusions of the study and their implications. Suggest areas for further research, if appropriate.

Abstract for Systematic Review Articles should be no more than 350 words giving details of what was done using the following structure where applicable:

- **Background:** Provide a brief introduction of the subject and why it is important.
- **Aim:** Give a clear statement of the main aim of the study and the main hypothesis tested, if any.
- **Data sources:** Describe the databases searched.
- **Study eligibility criteria, participants, and interventions:** Briefly describe the methods adopted including exclusion/inclusion criteria.
- **Study appraisal and synthesis methods:** Describe bias, study type and quality
- **Results:** Give the main results of the review, including the outcome of any statistical meta-analysis.
- **Limitations:** Highlight problems with the current review and research area
- **Conclusions and implications of key findings:** State the primary conclusions of the study and their implications. Suggest areas for further research, if appropriate.

Abstract for Review Articles (narrative)

The Abstract should be unstructured and no more than 350 words.

Abstract for Case Reports should be no more than 350 words using the following structure:

- **Aim:** Give a clear statement of the main aim of the report and the clinical problem which is addressed.
- **Summary:** Describe the methods adopted including, as appropriate, the design of the study, the setting, entry requirements for subjects, use of materials, outcome measures and analysis if any.
- **Key learning points:** Provide up to 5 short, bullet-pointed statements to highlight the key messages of the report. All points must be fully justified by material presented in the report.

Abstract for Clinical Articles should be no more than 350 words using the following structure:

- **Aim:** Give a clear statement of the main aim of the report and the clinical problem which is addressed.
- **Methodology:** Describe the methods adopted.
- **Results:** Give the main results of the study.
- **Conclusions:** State the primary conclusions of the study.

Main Text of Original Scientific Article should include Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion and Conclusion

Introduction: should be focused, outlining the historical or logical origins of the study and gaps in knowledge. Exhaustive literature reviews are not appropriate. It should close with the explicit statement of the specific aims of the investigation, or hypothesis to be tested.

Material and Methods: must contain sufficient detail such that, in combination with the references cited, all clinical trials and experiments reported can be fully reproduced.

(i) **Clinical Trials** should be reported using the CONSORT guidelines available at www.consort-statement.org. A [CONSORT checklist](#) and flow diagram (as a Figure) should also be included in the submission material.

(ii) **Experimental Subjects:** experimentation involving human subjects will only be published if such research has been conducted in full accordance with ethical principles, including the World Medical Association [Declaration of Helsinki](#) (version 2008) and the additional requirements, if any, of the country where the research has been carried out. Manuscripts must be accompanied by a statement that the experiments were undertaken with the

understanding and written consent of each subject and according to the above mentioned principles. A statement regarding the fact that the study has been independently reviewed and approved by an ethical board should also be included. Editors reserve the right to reject papers if there are doubts as to whether appropriate procedures have been used.

When experimental animals are used the methods section must clearly indicate that adequate measures were taken to minimize pain or discomfort. Experiments should be carried out in accordance with the Guidelines laid down by the National Institute of Health (NIH) in the USA regarding the care and use of animals for experimental procedures or with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and in accordance with local laws and regulations.

All studies using human or animal subjects should include an explicit statement in the Material and Methods section identifying the review and ethics committee approval for each study, if applicable. Editors reserve the right to reject papers if there is doubt as to whether appropriate procedures have been used.

(iii) Suppliers: Suppliers of materials should be named and their location (Company, town/city, state, country) included.

Results: should present the observations with minimal reference to earlier literature or to possible interpretations. Data should not be duplicated in Tables and Figures.

Discussion: may usefully start with a brief summary of the major findings, but repetition of parts of the abstract or of the results section should be avoided. The Discussion section should progress with a review of the methodology before discussing the results in light of previous work in the field. The Discussion should end with a brief conclusion and a comment on the potential clinical relevance of the findings. Statements and interpretation of the data should be appropriately supported by original references.

Conclusion: should contain a summary of the findings.

Main Text of Review Articles should be divided into Introduction, Review and Conclusions. The Introduction section should be focused to place the subject matter in context and to justify the need for the review. The Review section should be divided into logical sub-sections in order to improve readability and enhance understanding. Search strategies must be described and the use of state-of-the-art evidence-based systematic approaches is expected. The use of tabulated and illustrative material is encouraged. The Conclusion section should reach clear conclusions and/or recommendations on the basis of the evidence presented.

Main Text of Clinical Reports and Clinical Articles should be divided into Introduction, Report, Discussion and Conclusion,. They should be well illustrated with clinical images, radiographs, diagrams and, where appropriate, supporting tables and graphs. However, all illustrations must be of the highest quality

Acknowledgements: *International Endodontic Journal* requires that all sources of institutional, private and corporate financial support for the work within the manuscript must be fully acknowledged, and any potential conflicts of interest noted. Grant or contribution numbers may be acknowledged, and principal grant holders should be listed. Acknowledgments should be brief and should not include thanks to anonymous referees and editors. See also above under Ethical Guidelines.

5.3.

References

It is the policy of the Journal to encourage reference to the original papers rather than to literature reviews. Authors should therefore keep citations of reviews to the absolute minimum.

We recommend the use of a tool such as [EndNote](#) or [Reference Manager](#) for reference management and formatting. The EndNote reference style can be obtained upon request to the editorial office (ieeditor@cardiff.ac.uk). Reference Manager reference styles can be searched for here: www.refman.com/support/rmstyles.asp

In the text: single or double authors should be acknowledged together with the year of publication, e.g. (Pitt Ford & Roberts 1990). If more than two authors the first author followed by *et al.* is sufficient, e.g. (Tobias *et al.* 1991). If more than 1 paper is cited the references should be in year order and separated by ", " e.g. (Pitt Ford & Roberts 1990, Tobias *et al.* 1991).

Reference list: All references should be brought together at the end of the paper in alphabetical order and should be in the following form.

- (i) Names and initials of up to six authors. When there are seven or more, list the first three and add *et al.*
- (ii) Year of publication in parentheses
- (iii) Full title of paper followed by a full stop (.)
- (iv) Title of journal in full (in italics)
- (v) Volume number (bold) followed by a comma (,)
- (vi) First and last pages

Examples of correct forms of reference follow:

Standard **journal** **article**
 Bergenholtz G, Nagaoka S, Jontell M (1991) Class II antigen-expressing cells in experimentally induced pulpitis. *International Endodontic Journal* **24**, 8-14.

Corporate **author**
 British Endodontic Society (1983) Guidelines for root canal treatment. *International Endodontic Journal* **16**, 192-5.

Journal **supplement**
 Frumin AM, Nussbaum J, Esposito M (1979) Functional asplenia: demonstration of splenic activity by bone marrow scan (Abstract). *Blood* **54** (Suppl. 1), 26a.

Books and other monographs

Personal **author(s)**
 Gutmann J, Harrison JW (1991) *Surgical Endodontics*, 1st edn Boston, MA, USA: Blackwell Scientific Publications.

Chapter **in** **a** **book**
 Wesselink P (1990) Conventional root-canal therapy III: root filling. In: Harty FJ, ed. *Endodontics in Clinical Practice*, 3rd edn; pp. 186-223. London, UK: Butterworth.

Published **proceedings** **paper**
 DuPont B (1974) Bone marrow transplantation in severe combined immunodeficiency with an unrelated MLC compatible donor. In: White HJ, Smith R, eds. *Proceedings of the Third Annual Meeting of the International Society for Experimental Rematology*; pp. 44-46. Houston, TX, USA: International Society for Experimental Hematology.

Agency **publication**
 Ranofsky AL (1978) *Surgical Operations in Short-Stay Hospitals: United States-1975*. DHEW publication no. (PHS) 78-1785 (Vital and Health Statistics; Series 13; no. 34.) Hyattsville, MD, USA: National Centre for Health Statistics.8

Dissertation **or** **thesis**
 Saunders EM (1988) *In vitro and in vivo investigations into root-canal obturation using thermally softened gutta-percha techniques (PhD Thesis)*. Dundee, UK: University of Dundee.

URLs

Full reference details must be given along with the URL, i.e. authorship, year, title of document/report and URL. If this information is not available, the reference should be removed and only the web address cited in the text.

Smith A (1999) Select committee report into social care in the community [WWW document].
 URL <http://www.dhss.gov.uk/reports/report015285.html>
 [accessed on 7 November 2003]

5.4. Tables, Figures and Figure Legends

Tables: Tables should be double-spaced with no vertical rulings, with a single bold ruling beneath the column titles. Units of measurements must be included in the column title.

Figures: All figures should be planned to fit within either 1 column width (8.0 cm), 1.5 column widths (13.0 cm) or 2 column widths (17.0 cm), and must be suitable for photocopy reproduction from the printed version of the manuscript. Lettering on figures should be in a clear, sans serif typeface (e.g. Helvetica); if possible, the same typeface should be used for all figures in a paper. After reduction for publication, upper-case text and numbers should be at least 1.5-2.0 mm high (10 point Helvetica). After reduction, symbols should be at least 2.0-3.0 mm high (10 point). All half-tone photographs should be submitted at final reproduction size. In general, multi-part figures should be arranged as they would appear in the final version. Reduction to the scale that will be used on the page is not necessary, but any special requirements (such as the separation distance of stereo pairs) should be clearly specified.

Unnecessary figures and parts (panels) of figures should be avoided: data presented in small tables or histograms, for instance, can generally be stated briefly in the text instead. Figures should not contain more than one panel unless the parts are logically connected; each panel of a multipart figure should be sized so that the whole figure can be reduced by the same amount and reproduced on the printed page at the smallest size at which essential details are visible.

Figures should be on a white background, and should avoid excessive boxing, unnecessary colour, shading and/or decorative effects (e.g. 3-dimensional skyscraper histograms) and highly pixelated computer drawings. The vertical axis of histograms should not be truncated to exaggerate small differences. The line spacing should be wide enough to remain clear on reduction to the minimum acceptable printed size.

Figures divided into parts should be labelled with a lower-case, boldface, roman letter, a, b, and so on, in the same typesize as used elsewhere in the figure. Lettering in figures should be in lower-case type, with the first letter capitalized. Units should have a single space between the number and the unit, and follow SI nomenclature or the nomenclature common to a particular field. Thousands should be separated by a thin space (1 000). Unusual units or abbreviations should be spelled out in full or defined in the legend. Scale bars should be used rather than magnification factors, with the length of the bar defined in the legend rather than on the bar itself. In general, visual cues (on the figures themselves) are preferred to verbal explanations in the legend (e.g. broken line, open red triangles etc.)

Figure legends: Figure legends should begin with a brief title for the whole figure and continue with a short description of each panel and the symbols used; they should not contain any details of methods.

Permissions: If all or part of previously published illustrations are to be used, permission must be obtained from the copyright holder concerned. This is the responsibility of the authors before submission.

Preparation of Electronic Figures for Publication: Although low quality images are adequate for review purposes, print publication requires high quality images to prevent the final product being blurred or fuzzy. Submit EPS (lineart) or TIFF (halftone/photographs) files only. MS PowerPoint and Word Graphics are unsuitable for printed pictures. Do not use pixel-oriented programmes. Scans (TIFF only) should have a resolution of 300 dpi (halftone) or 600 to 1200 dpi (line drawings) in relation to the reproduction size (see below). EPS files should be saved with fonts embedded (and with a TIFF preview if possible). For scanned

images, the scanning resolution (at final image size) should be as follows to ensure good reproduction: lineart: >600 dpi; half-tones (including gel photographs): >300 dpi; figures containing both halftone and line images: >600 dpi.

Further information can be obtained at Wiley Blackwell's guidelines for figures: <http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp>.

Check your electronic artwork before submitting it: <http://authorservices.wiley.com/bauthor/eachecklist.asp>.