



Universidade Federal de Minas Gerais UFMG
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Microbiologia
Curso de Especialização em Microbiologia



**Avaliação “in vitro” da viabilidade de *Enterococcus faecalis* nos
túbulos dentinários após a aplicação de Hipoclorito de sódio
5.25% e Bio-Pure MTADPure MTAD® e Clorexidina 2%**

SEBASTIÃO DINIZ FILHO

BELO HORIZONTE

2011

SEBASTIAO DINIZ FILHO

**Avaliação “in vitro” da viabilidade de *Enterococcus faecalis* nos
túbulos dentinários após a aplicação de Hipoclorito de sódio
5.25% e Bio-Pure MTAD® e Clorexidina 2%**

**MONOGRAFIA APRESENTADA AO PROGRAMA
DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA DO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMO PRÉ-REQUISITO PARA A OBTENÇÃO DO
GRAU DE ESPECIALISTA EM MICROBIOLOGIA**

ORIENTADOR – DANIEL DE ASSIS SANTOS

CO-ORIENTADORA – BETÂNIA MARIA SOARES

BELO HORIZONTE

2011

Dedico este trabalho à minha mãe, pelo incentivo e apoio na realização deste e de todo curso de minha vida, e à minha irmã Glorinha, exemplo de fé e de simplicidade envolventes.

*“Não procures jamais o passado no presente.
Olha, sobe, vai caminhando, cruza ruas e
avenidas. Lá bem no alto, de onde se avista a
cidade, verás um portão largo, sempre aberto.
Entra”.*

Coralina

Cora

Agradecimentos

Querido Deus, que me conhece e me guia nos caminhos que escolho. Muito obrigado.

A minha orientadora Betânia, pela dedicação. Foi para mim um privilégio trabalhar com você.

Amanda, obrigado pelas orientações na montagem deste trabalho, sempre com o sorriso e boa vontade que lhes são peculiares.

Meus colegas Bia, Geralda e Alessandro, obrigado pela paciência e pelo carinho no acompanhamento dos estudos.

Todos os professores, auxiliares e funcionários do ICB, obrigado.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	ii
LISTA DE ABREVIATURAS	iii
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
1. Introdução	1
2. Justificativa	4
3. Revisão de Literatura	5
3.1 Doença Periapical - Generalidades	5
3.2 <i>Enterococcus faecalis</i> – Taxonomia - Morfologia - Fisiologia	5
3.3 Testes de Identificação de Espécies	7
3.4 Fatores de Virulência e Patogenicidade	11
3.4.1 Substância de Agregação	11
3.4.2 Adesinas de Superfície	12
3.4.3 Feromonas Sexuais	13
3.4.4 Ácido lipoteicóico	13
3.4.5 Produção de Superóxido Extracelular	14
3.4.6 Gelatinase – Citolisinas	14
3.4.7 <i>E. faecalis</i> e os Túbulos Dentinários	15
3.4.8 Interações <i>E. faecalis</i> e Outras Bactérias – Formação de Biofilme	16
3.5 Modulação da Resposta Imune do Hospedeiro – Processo Inflamatório	20
3.6 Resistência a Antimicrobianos Sistêmicos	21
3.7 Ecologia - Estado Fisiológico da Bactéria	22
3.8 Tratamento do Sistema de Canais Radiculares - Soluções Irrigadoras	24
3.8.1 Clorexidina	25
3.8.2 Hipoclorito de Sódio	27
3.8.3 MTAD	28
4. Objetivos	30
4.1 Objetivos Gerais	30
4.2 Objetivos Específicos	30
5. Metodologia	31
6. Resultados e Discussão	32
6.1. Discussão dos Resultados Referentes a NaOCl e CHX	32
6.2. Discussão dos Resultados Referentes a MTAD	41
7. Conclusões	50
8. Referências Bibliográficas	51

LISTA DE TABELAS

Tabela I – Taxonomia de *Enterococcus faecalis*

6

LISTA DE ABREVIATURAS

ALP = Fosfatase alcalina (alkaline phosphatase)
AS = Substância de agregação (aggregation substance)
BHI = Infusão de cérebro e coração (brain heart Infusion)
BS = Substância de adesão (binding substance)
BSA = Albumina do soro bovino (bovine serum albumine)
BSP = Sialoproteína do osso (bone sialprotein)
Ca(OH)₂ = Hidróxido de cálcio
CHX = Clorexidina (chlorhexidine)
CR = Canal radicular
DMEM = Meio de Eagle modificado por Dulbecco (dulbecco's modified eagle medium)
DMSO = Dimetilsulfóxido (dimethyl sulfoxide)
DNA = Ácido desoxirribonucléico (deoxyribonucleic acid)
ECM = Matriz extracelular (extracellular matrix)
EDTA = Ácido etilenodiaminotetracético
EPS = Substância polimérica extracelular (extracellular polymeric substance)
GlcNAc = N-acetil glicosamina
HCIO = Ácido hipocloroso
H₂O₂ = Peróxido de hidrogênio
IL-1β = Interleucina I beta
IL-6 = Interleucina seis
IL-8 = Interleucina oito
INF-γ = Interferon gama
ISO = Organização internacional de padronização (international standards organization)
LPS = Lipopolissacarídeo
LTA = Ácido lipoteicóico
MBC = Concentração bactericida mínima (minimal bactericidal concentration)
MEV = Microscopia eletrônica de varredura
MIC = Concentração inibitória mínima (minimal inhibitory concentration)
MurNAc = Ácido N-acetil murâmico
NaCl = Cloreto de Sódio
NaOCl = Hipoclorito de Sódio
PBS = Salina tamponada com PO₄ (phosphate buffered saline)
PCR = Reação em cadeia da polimerase (polimerase chain reaction)
PGE2 = Prostaglandina dois
PMNs = Neutrófilos polimorfonucleares
RNAm = Ácido ribonucléico mensageiro (ribonucleic acid)
RTF = Meio de transporte reduzido (reduced fluid transport)
SCR = Sistema de canais radiculares
SCS = Solução de caseína de soja
TBS = Caldo de soja tripsina (trypticase soy broth)
TH = Meio Todd Hewitt
TNF-α = Fator de necrose tumoral alfa
TNF-β = Fator de necrose tumoral beta
TSA = Agar de soja tripsina (trypticase soy agar)
UFC = Unidade formadora de colônias (colony forming units)

UV = Ultra violeta
VBNC = Viável mas não cultivável (viable but not cultivable)
WCP = Proteína celular total (whole celular protein)
S = Subunidades ribossomais de Svedberg

Enterococcus faecalis tem sido associado à inflamação apical persistente em situações clínicas, podendo sobreviver em ambiente com escassez de nutrientes, organizar-se em biofilme, resistindo à instrumentação químico-mecânica e às medicações intracanal utilizadas corriqueiramente. Este microrganismo e seus produtos tóxicos são responsáveis pelo desenvolvimento e persistência da periodontite apical de origem endodôntica. Numerosas medidas foram descritas para reduzir o número de microrganismos do canal radicular, incluindo o uso de diferentes técnicas de instrumentação, regimes de irrigação e medicação intracanal. Um grande número de abordagens *in vivo* e *in vitro* têm sido utilizadas no esforço de determinar a eficácia dos vários agentes desinfetantes contra os microrganismos envolvidos. A presente revisão de literatura teve como objetivo avaliar a eficácia das soluções irrigadoras: Hipoclorito de sódio, Bio-Pure MTAD® e Clorexidina, tomando como base os resultados obtidos em diferentes investigações. Para este estudo comparativo, foram utilizadas publicações clássicas e recentes referentes a cada solução, na tentativa de conhecer um protocolo de irrigação mais eficaz na erradicação do *Enterococcus faecalis* do sistema de canais radiculares.

Palavras-chave - *Enterococcus faecalis*, soluções irrigadoras do canal radicular, biofilme, MTAD, hipoclorito de sódio, clorexidina

Enterococcus faecalis has been associated to persistent periapical inflammation in clinical situations, with the ability to survive to environments with lack of nutrients, constitute

biofilms, resist to chemical-mechanical instrumentation and the medications used inside the root canal. This microorganism and its toxic bioproducts are responsible for the development and persistence of endodontic apical periodontitis. Numerous measures have been described in order to reduce the number of microorganisms in the root canal, including the use of different instrumentation techniques, irrigations regimes and intracanal medications. A great number of in vivo and in vitro approaches have been applied in an effort to determine the efficacy of several endodontic disinfecting agents against the involved microorganisms. The present review of literature aimed to evaluate the efficacy of irrigation solutions: Sodium hypochlorite, Bio-Pure MTAD[®] and Chlorhexidine, taking as base the results obtained in different investigations. Classical and recent publications, referring each of the three solutions, were used for this comparative study, with the aim of finding the most effective irrigating regime for eradicating *Enterococcus faecalis* from the root canal system.

Key-words - *Enterococcus faecalis*, irrigation solutions of radicular canal, biofilm, MTAD, sodium hypochlorite, chlorhexidine.

1. Introdução

As patologias pulpares e periradiculares são usualmente de natureza inflamatória e de etiologia bacteriana. Microrganismos e seus subprodutos exercem papel fundamental na introdução e, principalmente, na perpetuação de tais doenças. O tratamento endodôntico tem como principais objetivos a máxima eliminação da infecção instalada no sistema de canais radiculares (SCR) e a prevenção da introdução de novos microrganismos durante e após o tratamento.

A eliminação da infecção do canal radicular (CR) propicia um ambiente favorável ao reparo das lesões periapicais, enquanto que a persistência de microrganismos, como *Enterococcus faecalis*, exerce um papel relevante nas falhas do tratamento endodôntico.

Embora esta espécie bacteriana não seja uma habitante comum da cavidade oral, sem história de tratamento endodôntico, ela é frequentemente encontrada como uma espécie única nos pacientes com infecção pós-tratamento endodôntico. A recuperação frequente de *Enterococcus faecalis* de CR com insucesso do tratamento endodôntico tem sido amplamente relatada. Estudos demonstram uma prevalência de 29 a 77% no isolamento desta bactéria.

O *Enterococcus faecalis* pode se aderir às paredes do CR, acumular e formar comunidades organizadas em biofilme adquirindo resistência contra fagócitos, anticorpos e antimicrobianos. A sua resistência antimicrobiana e a habilidade de adaptação à ambientes adversos, tais como baixo pH, baixo teor de oxigênio e fraca nutrição, ajudam-no a persistir dentro do SCR, sendo o principal fator etiológico das lesões periradiculares persistentes.

A coroa do dente é o principal portal de entrada da bactéria para dentro do SCR, que pode utilizar o tecido cariado ou a exposição pulpar como acesso. Considerando uma exposição pulpar acidental, o microrganismo encontra o tecido pulpar e as paredes dentinárias livres de contaminação. Contudo, uma exposição dentinária pode ocorrer por abrasão, erosão, raspagem e alisamento radicular

durante o tratamento profilático da doença periodontal, levando à formação de fendas e à exposição de inúmeros túbulos dentinários. Outro possível caminho para a infecção do tecido pulpar é pelo forame apical ou pelos canais acessórios, levando a liquefação e necrose do tecido pulpar.

Uma vez penetrado o SCR, a aderência e a invasão dos túbulos dentinários são considerados os primeiros passos para a colonização bacteriana. O processo é mediado por componentes específicos da superfície da parede de *E. faecalis*, chamados adesinas de superfície, que promovem a sua ligação à algumas proteínas da matriz extracelular incluindo o colágeno do tipo I. Como o colágeno do tipo I é o principal componente orgânico da dentina, ele é considerado o maior substrato para a adesão deste microrganismo, fornecido pela própria dentina.

Embora o preparo químico-mecânico do SCR seja capaz de reduzir o número de bactérias, a completa desinfecção do CR é difícil devido a sua complexidade anatômica. Sendo assim, uma solução irrigadora do SCR, como, hipoclorito de sódio (NaOCl), torna-se necessária para auxiliar neste processo. NaOCl elimina bactérias efetivamente, e a sua atividade está vinculada à concentração e ao tempo de contato com o tecido. O seu uso durante o debridamento químico-mecânico leva a formação da “*smear layer*”, uma estrutura granular amorfa, constituída de tecido calcificado de 1 a 2 µm de espessura, misturado com fragmentos de processos odontoblásticos e materiais necróticos, aderidos à parede dentinária. Esta substância apresenta um potencial de contaminação inibindo ou retardando a penetração de agentes antimicrobianos, razão pela qual, a sua remoção foi recomendada. A inundação final com o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) seguida pela irrigação com NaOCl é um método efetivo para remoção da “*smear layer*” e dos **debris** superficiais das faces instrumentadas dos CR.

Uma nova solução irrigadora Bio-Pure MTAD® (Dentsply International, York, EUA), contendo uma mistura de um isômero da tetraciclina (doxiciclina), ácido cítrico e detergente (Tween-80), tem apresentado resultados promissores. Investigações recentes envolvendo o uso do MTAD demonstram sua habilidade

em desinfetar CR infectados, eliminar *E. faecalis* e remover a camada de “*smear layer*” produzida durante o preparo químico. A “*smear layer*” formada é composta de debris, material orgânico e microrganismos que se aderem às paredes dos canais radiculares obstruindo as aberturas dos túbulos dentinários. A doxiciclina e o ácido cítrico exibem propriedades antimicrobianas e de ataque ácido respectivamente.

A clorexidina tem sido amplamente sugerida como material para anti-sepsia de CR seja como substância química auxiliar durante o preparo químico-mecânico, ou como medicação intracanal entre sessões. Possui ação antimicrobiana imediata, amplo espectro de ação, relativa ausência de toxicidade, capacidade de absorção pela dentina e lenta liberação de substância ativa, prolongando sua atividade antimicrobiana residual. Mesmo apresentando a desvantagem de ser incapaz de dissolver tecido orgânico, a clorexidina se consolidou como material promissor para a desinfecção do SCR.

Considerando as ações antimicrobianas das soluções irrigadoras de clorexidina, hipoclorito de sódio e Biopure-MTAD® e a possibilidade de associação destas substâncias como medicação intracanal, esta revisão de literatura propõe revisar os resultados do desempenho antimicrobiano destes compostos sobre o *E. faecalis* presente no SCR.

2. Justificativa

Estudos microbiológicos da infecção endodôntica demonstram claramente que a bactéria presente no SRC necrosado pode ser encontrada no espaço do canal principal, lateral, e nos túbulos dentinários, dificultando a ação do sistema de defesa em alcançar e eliminar o microrganismo. Os sistemas de instrumentação, utilizados correntemente, deixam largas superfícies das paredes dentinárias não tocadas pelos instrumentos, enfatizando a importância da irrigação na remoção de debris, bactérias, produtos tóxicos e substratos necessários para o crescimento bacteriano e a consequente instalação de uma lesão inflamatória periapical.

O frequente relato de isolamento de *Enterococcus faecalis* a partir de amostras recolhidas de CRs que apresentaram insucesso no tratamento endodôntico, motivaram a seleção deste microrganismo para esta revisão de literatura. Com base nos resultados dos estudos dos autores referenciados, pode-se concluir que *E. faecalis* apresenta a capacidade de penetração nos túbulos dentinários e constituir um biofilme tornando-o resistente a ambientes adversos e aos processos de desinfecção utilizados na terapia endodôntica.

O sucesso do tratamento endodôntico depende da limpeza, formatação, desinfecção e selamento dos canais radiculares. A limpeza ocorre simultaneamente com o preparo químico-mecânico, desinfecção, eliminação do tecido pulpar degenerado e de dentina contaminada. Este processo ocorre pela ação dos instrumentos nas paredes dos canais radiculares e pelas propriedades antimicrobianas das soluções irrigadoras utilizadas durante o tratamento endodôntico. Desta forma, torna-se relevante o estudo detalhado das propriedades das substâncias auxiliares no tratamento endodôntico, com o objetivo de se alcançar a completa desinfecção dos CR.

3. Revisão de literatura

3.1 Doença Periodontal – Generalidades

A periodontite apical é causada por bactérias e seus subprodutos no SCR que, se não tratada, pode evoluir para reabsorção do osso alveolar como resposta da defesa do organismo contra a invasão de microrganismos no CR. O sucesso do tratamento da periodontite apical envolve a eliminação bacteriana pelo preparo químico-mecânico associado à irrigação, o uso de medicação intracanal temporária e a adequada restauração permanente do dente (PORTENIER et al., 2005).

Embora raro nas infecções primárias, *Enterococcus faecalis* pode ser considerado um patógeno, uma vez que é usualmente isolado em culturas puras de infecções persistentes, como nos casos de retratamento de periodontites apicais. As dificuldades de eliminação deste patógeno são relacionadas à sua capacidade de penetrar profundamente os túbulos dentinários, resistir às medicações antimicrobianas e as condições ambientais locais precárias durante e após a terapia do CR. Além disso, os diferentes componentes da dentina, como o colágeno do tipo I, tem o potencial de inibir a atividade antibacteriana das medicações e favorecer a aderência da bactéria às paredes dentinárias (PORTENIER et al., 2005).

3.2 *Enterococcus faecalis*: Taxonomia - Morfologia - Fisiologia

Até meados de 1980, enterococos não eram destacados como um gênero separadamente, muito embora suas características particulares já fossem reconhecidas entre os estreptococos. As observações básicas de coloração, forma de células e arranjo, bem como a ausência de catalase classificou enterococos no gênero *Streptococcus*. A classificação de Lancefield e a descoberta do antígeno grupo D estabeleceram enterococos como estreptococos grupo D salino-tolerante. O antígeno grupo D é um ácido lipoteicoico (LTA) encontrado em quase todas as bactérias Gram-positivas e difere dos grupos de antígenos de outros

estreptococos. Isto levou a aumentar o interesse pelas características fisiológicas e genéticas relacionadas a outros estreptococos e cocos Gram-positivos (PORTENIER et al., 2003).

Em 1984, foi dado aos enterococos o status formal de gênero, após estudos de hibridização DNA-DNA e DNA-RNA terem demonstrado uma relação mais distante com os estreptococos, introduzido-se dois novos gêneros; *Lactococcus* e *Enterococcus*. Dentre o gênero *Enterococcus*, *E. faecalis* é mais prevalente (PORTENIER et al., 2003). A classificação taxonômica de *E. faecalis* está demonstrada na tabela 1

TABELA I – Taxonomia de *Enterococcus faecalis*

Domínio	<i>EUBACTERIA</i>
Reino	<i>BACTÉRIA</i>
Filo	<i>FIRMICUTES</i>
Classe	<i>BACILLI</i>
Ordem	<i>LACTOBACILLALES</i>
Família	<i>ENTEROCOCCACEAE</i>
Gênero	<i>Enterococcus</i>
Espécie	<i>Enterococcus faecalis</i>

Estes cocos Gram-positivos se apresentam como células de formato esférico, oval ou cocobacilar, aos quais podem se arranjar aos pares ou em pequenas cadeias. As células de enterococos são esféricas ou ovóides, não formam endosporos e algumas espécies podem mover-se por raras flagelos. Com frequência, a morfologia microscópica destes microrganismos não pode ser diferenciada daquela dos *Streptococcus pneumoniae*. Na sua grande maioria são anaeróbios facultativos, mas algumas espécies são estritamente aeróbias (PORTENIER et al., 2003).

Podem tolerar condições ambientais rigorosas com temperaturas de 10°C a 45°C, pH de 9.6, meio contendo NaCl 6.5%, sobrevivendo a 60°C por 30 minutos. *E. faecalis* pode se tornar menos sensível a níveis letais de sulfato de sódio, sais biliares, hiperosmolaridade, calor, etanol, peróxido de hidrogênio, acidez e alcalinidade. Células enterocócicas em ausência de nutrição conseguem manter a viabilidade por longo período de tempo, tornando-se resistentes à irradiação UV, ao calor, hipoclorito de sódio, peróxido de hidrogênio e etanol (GIARD et al., 1996).

Espécie *Enterococcus* spp. vive em vastas quantidades [10^5 - 10^8 unidade formadora de colônias (UFC) por grama de fezes] no lúmen intestinal humano e na maioria das circunstâncias não causam danos aos seus hospedeiros. Catabolizam uma variedade de fontes de energia incluindo carboidratos, glicerol, lactato, malato, citrato, arginina e muitos α -ceto-ácidos. Resistem aos sais biliares, detergentes, metais pesados, etanol, e desidratação (STUART et al., 2006).

Estudos *in vitro* têm mostrado que grande quantidade de *E. faecalis* invade os túbulos dentinários, coloniza a luz do canal radicular e sobrevive sem o suporte de outras bactérias. Nem todas as bactérias possuem estas habilidades (ØRSTAVIK e HAAPASALO, 1990).

3.3 Testes de Identificação de Espécies

As 23 espécies *Enterococcus* spp. correntemente existentes podem ser divididas em cinco grupos, baseado no metabolismo de manitol, sorbose e arginina. *E. faecalis* pertence ao mesmo grupo do *E. faecium*, *E. casseliflavus*, *E. mundtii* e *E. gallinarum*. Estas cinco espécies formam ácido em meio manitol e hidrolisam arginina, entretanto, elas não formam ácido em meio sorbose. *E. faecalis* pode ainda ser identificado por testes com arabinose, piruvato e telureto. Esta bactéria é arabinose negativo e, exceto para algumas variantes atípicas, é o único membro do grupo que utiliza o piruvato e é resistente ao telureto. Aproximadamente, um terço das culturas de *E. faecalis* pode ser β -hemolítico em ágar contendo sangue

de coelho, cavalo ou humano, porem não-hemolítico em ágar sangue de carneiro(STUART et al., 2006).

O método de cultivo possibilita a identificação de uma grande variedade de espécies microbianas numa amostra clínica, a susceptibilidade antimicrobiana dos isolados, e o estudo da sua fisiologia e patogencidade. Entretanto apresentam várias limitações: são dispendiosas; podem levar dias ou semanas para identificar algumas bactérias anaeróbicas fastidiosas podendo atrasar o tratamento antimicrobiano. A sensibilidade muito pequena, particularmente para anaeróbios, e a especificidade pode ser baixa e estar na dependência da experiência do microbiologista. Estas técnicas consomem tempo e são trabalhosas. Finalmente, a impossibilidade de cultivo de um grande número de espécies bacterianas, bem como a dificuldade de identificação de muitas espécies cultiváveis, representam os maiores obstáculos na abordagem do método de cultivo (SIQUEIRA JR E ROÇAS, 2005).

Os procedimentos de identificação bacteriana baseados no fenótipo encontram alguns obstáculos que podem resultar na subestimação de microrganismos que vivem num dado ecossistema, como nos CR obturados. Tomar uma amostra representativa de canais obturados não é uma tarefa fácil por causa das limitações impostas pelas constrições físicas dos CR e pela presença do material obturador. Os microrganismos que resistem ao tratamento endodôntico podem existir em número muito pequeno dentro do SCR ou podem estar localizados em áreas de difícil acesso às pontas de papel utilizadas para amostragem. Sendo assim, um pequeno número de células bacterianas pode ser coletado, reduzindo a sensibilidade do método de identificação destes microrganismos (ROÇAS, 2004).

Os métodos moleculares que envolvem a amplificação da porção 16s do DNAr, seguido pela clonagem e sequenciamento, têm sido utilizados recentemente para determinar a diversidade bacteriana nos sedimentos do fundo do mar, águas termais, humanos doentes e saudáveis. Estes métodos são eficientes e sua significativa contribuição para a microbiologia está relacionada

com a identificação de patógenos previamente desconhecidos (SIQUEIRA JR e ROÇAS, 2005).

Estes métodos apresentam várias vantagens sobre os convencionais de identificação microbiana como: detecção espécies cultiváveis e de cepas de espécies microbianas não cultiváveis; alta especificidade e exatidão na identificação de cepas microbianas com comportamento fenotípico ambíguo; detecção de espécies microbianas diretamente das amostras clínicas sem necessidade de cultivo; diagnóstico rápido, particularmente vantajoso nas doenças graves ou naquelas causadas por microrganismos de crescimento lento; não demandam o cuidadoso controle das condições de ambiente anaeróbico durante a amostragem e transporte. O processo da reação em cadeia de polimerase (PCR), concebido por Kary Mullis (1983) vem revolucionando o campo da biologia molecular, por ter a capacidade de amplificar uma cópia de genes em milhões ou bilhões de cópias, possibilitando isolar qualquer gene de um microrganismo (SIQUEIRA e ROÇAS, 2005).

Zoletti et al. (2006), comparando dois métodos de identificação do *Enterococcus faecalis*, o procedimento de cultura e a PCR, asseguram que os resultados obtidos corroboram com os resultados de outros estudos que demonstram a superioridade do método molecular. A alta prevalência de *E. faecalis* detectada pela PCR se deve a habilidade do método molecular em detectar DNA de células mortas. Apesar do fato de que as células mortas podem ser atacadas por outras bactérias e fungos, e a oxidação e hidrólise poderem danificar o DNA causando perdas irreversíveis na sequência de informação. Mesmo em pequena amostra de células do CR, o método molecular é mais sensível, exato e fiel que o método convencional. Algumas cepas bacterianas, numa dada espécie cultivável, podem se tornar incultiváveis, VBNC (Viáveis mas não cultiváveis), desenvolvendo uma estratégia de sobrevivência quando submetidas a condições ambientais adversas, como falta de nutrientes. Nestas condições, o microrganismo escapa da identificação pelo método de cultura, mas continua viável, sendo o método molecular mais indicado para a sua identificação.

Uma desvantagem nos protocolos da PCR para identificação de espécies em amostra de CR é que os microrganismos têm que ser lesados para se obter acesso ao seu material cromossômico. Além disso, na ausência de células cultiváveis, não é possível conduzir investigações adicionais para identificar os fatores de virulência que podem estar associados com uma cepa patogênica em particular (LEE et al., 2004). Bactérias viáveis também são requeridas para acessar os efeitos antimicrobianos dos medicamentos endodônticos (ABDULLAH M., 2005).

A larga prevalência do *E. faecalis* entre os estudos referentes à infecção persistente do SCR, pode ser atribuída às diferentes técnicas de identificação, diferenças geográficas, ou tamanho das amostras, (FOUAD AF, 2005, BAUMGARTER et al., 2004). Em alguns casos, *E. faecalis* foi detectado como o único microrganismo (cultura pura) presente nos CR obturados e com lesões perirradiculares (SUNDQVIST et al., 1998, PINHEIRO et al, 2003). A maioria destes estudos foi conduzida por meio da técnica de cultivo. Como de fato, a prevalência de enterococos nas infecções endodônticas primárias e nas infecções persistentes tem sido quase que exclusivamente reportada por estudos que utilizam o método de cultivo (MOLANDER et al., 1998, SUNDQVIST et al., 1998). Em relação à detecção de *E. faecalis* pelo método de cultivo (24-70%), a bactéria foi encontrada consistentemente em maiores porcentagens (67-77%) quando utilizado o método da PCR (ROÇAS et al., 2004).

Mais de 700 espécies bacterianas diferentes, das quais 50% ainda não cultivadas, foram detectadas na cavidade oral. Com respeito às infecções endodônticas, a maioria dos trabalhos utiliza cultivo de bactéria e poucos têm adotado métodos moleculares. Assim, uma nova compreensão das infecções endodônticas está lentamente emergindo dos resultados dos estudos moleculares e de microscopia eletrônica que afirmam que a microbiota das infecções endodônticas é bem similar à da bolsa periodontal em pacientes com doença periodontal ativa. Até mesmo o número de espécies organismos infectados nos biofilmes periodontais e endodônticos maduros são similares àquele encontrado

nas amostras de CR infectados, lesão periapical e nas placas bacterianas de pacientes com doença periodontal ativa (TRONSTAD e SUNDE, 2003).

3.4 Fatores de Virulência

Fatores de virulência determinam o grau em que um patógeno pode causar doença. (KAYAOGLU e ØRSTAVIK, 2004) Para que uma bactéria atue como patogênica ela tem que colonizar o hospedeiro. Inicialmente há uma associação física entre o microrganismo e a superfície do tecido, estabelecendo-se adesões fortes e permanentes por meio de processos de união de adesinas da superfície da célula microbiana com receptores da superfície do hospedeiro. Uma vez aderidas, as células utilizam os nutrientes disponíveis no ambiente, competem ou cooperam com outras espécies bacterianas, e evadem dos mecanismos de defesa do hospedeiro. Instalados estes mecanismos em múltiplos sítios, o hospedeiro torna-se colonizado (JEKINSON, 1997).

E. faecalis possui certos fatores de virulência incluindo enzimas líticas, citolisinas, substâncias de agregação, feromônas e ácido lipoteicóico. Tem a capacidade de adesão às células do hospedeiro e de expressar proteínas que permitem-no competir com outras células bacterianas e alterar a resposta do hospedeiro pela capacidade de suprimir ação de neutrófilos, macrófagos e linfócitos, contribuindo potencialmente para falhas do tratamento endodôntico. (STUART et al., 2006).

3.4.1 Substância de Agregação (AS)

SA é uma adesina codificada pelo plasmídeo da bactéria e media o contato com o hospedeiro. Está presente na superfície e nas partes mais internas da parede celular (WANNER et al., 1989), sendo responsável pela adesão às proteínas da matriz extracelular (ECM), incluindo o colágeno tipo I. Cepas de *E. faecalis* que expressam AS unem-se ao colágeno tipo I duas vezes mais que

fortemente que cepas AS negativas. A união ao colágeno tipo I pela bactéria tem particular importância nas infecções endodônticas, uma vez que este é o principal componente orgânico da dentina (PORTENIER et al., 2003).

A SA é conhecida por promover uma união direta opsonina-independente de *E. faecalis* a neutrófilos humanos. Consequentemente, *E. faecalis* SA positivo, apresenta resistência à fagocitose por neutrófilos e à ativação neutrofílica. A SA foi também reconhecida por promover adesão opsonina-independente à fagocitose de *E. faecalis* pelos macrófagos humanos, facilitando o tempo de sobrevivência intracelular da bactéria nesta célula, servindo como um fator de proteção contra os mecanismos de defesa do organismo (RAKITA et al., 1999).

As moléculas de SA constituem superantígenos quando em combinação com substâncias de adesão (BS), moléculas produzidas por bactérias, vírus, parasitas, e leveduras, que podem induzir uma inflamação pela estimulação de linfócitos T, seguida pela intensa liberação de citocinas inflamatórias, resultando em injúria tecidual. Extratos celulares de *E. faecalis* SA e BS positivos induziram a proliferação de linfócitos T com subsequente liberação de fator de necrose tumoral (TNF- β) e interferon gama (INF- γ), bem como ativação de macrófagos com liberação de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (SCHLIEVERT et al., 1998).

A capacidade da bactéria aderir-se ao colágeno foi apresentada como importante papel na patogênese das endocardites. Uma vez que os tecidos dentinários apresentam as mesmas proteínas da matriz extracelular (ECM) que o tecido cardíaco, o papel para a SA nas endocardites pode ser também de relevância nas infecções endodônticas (HIENZ et al., 1996).

3.4.2 Adesinas de Superfície (esp)

São proteínas de superfície com alto peso molecular presentes no gênero *Enterococcus* spp. isolada nas bacteremias e endocardites, mas raramente isolada nas fezes de indivíduos saudáveis. Está associada com o aumento da

hidrofobicidade, adesão primária e formação do biofilme pelo *E. faecalis* nas superfícies mineralizadas das paredes dentinárias (ARCHIMBAUD et al., 2002).

Portenier et al., (2003) afirmam que a adesina de superfície *esp* é uma longa cadeia cromossômica codificada na superfície da proteína com uma arquitetura especial que contém múltiplas repetições de modelo. O papel na virulência da adesina de superfície *esp* não foi esclarecido, mas acredita-se que esteja relacionado com proteção contra o sistema imunológico. Apenas a região terminal (N-Terminal) da proteína participa da interação com o hospedeiro, resultando em maior dificuldade de reconhecimento pelo sistema imunológico, podendo ser agravada nas condições de imunodeficiência. Esta observação sugere um papel da *esp* como fator de virulência dos *E. faecalis*.

3.4.3 Feromonas Sexuais – Pilis Sexuais

Feromonas sexuais são pequenos peptídeos codificados pelo cromossoma de *E. faecalis*, com a função de sinalizar e transferir certos plasmídeos conjugativos. Uma cepa receptora secreta no meio a feromona sexual correspondente ao plasmídeo que ela não contém. Em resposta, a cepa doadora produz AS promovendo forte contato com a cepa receptora, facilitando assim a transferência conjugativa do plasmídeo replicado. Após adquirida a cópia do plasmídeo, o receptor expulsa toda a produção daquela feromona, continuando a secretar feromonas específicas para outros plasmídeos que ela não contém. A resistência antimicrobiana e produção de citolisina, podem ser disseminadas entre cepas de *E. faecalis* via sistema de feromonas sexuais (CLEWELL e WEAVER, 1989).

3.4.4 Ácido Lipoteicóico (LTA)

Os ácidos lipoteicóicos (LTA) isolados de cepas de *E. faecalis* e outras bactérias Gram-positivas agem como estimuladores de leucócitos, monócitos e macrófagos na liberação de mediadores inflamatórios como: TNF- α , interleucina 1 beta (IL-1 β), IL-6, IL-8, prostaglandinas E2 (PGE2) e enzimas lisossomiais

(KAYAOGLU e ØRSTAVIK, 2004). Estão presente na superfície de células Gram-positivas. Constitui-se de um lipídeo poliglicerolfosfato contendo LTA, ligado também a uma variedade de células eucariotas incluindo: eritrócitos, linfócitos e células epiteliais (KAYAOGLU e ØRSTAVIK, 2004).

O LTA de *E. faecalis* tem a condição de inibir a autólise das paredes de suas células intactas ou isoladas. Assim, o LTA pode estar associado à resistência contra medicações aplicadas no CR durante o tratamento endodôntico. (SIGNORETTO et al., 2000).

O LTA exerce um importante papel na formação do biofilme, provendo resistência bacteriana a antibióticos ou desinfetantes. A criação de anticorpos pelo hospedeiro durante uma infecção com *E. faecalis* é dirigida diretamente contra o LTA. Contribui para a virulência do *E. faecalis* pela facilitação da formação de substância de agregação e transferência de plasmídeo (BAIK et al., 2008; SIGNORETTO et al., 2000).

3.4.5 Produção de Superóxido Extracelular

O ânion superóxido e outros radicais de oxigênio exercem um efeito destrutivo sobre uma variedade de componentes biológicos, tais como lípidos, proteínas e ácidos nucleicos. A produção de superóxido pelos neutrófilos e por outras células fagocitárias é essencial para a morte do microrganismo, no entanto, sua produção causa dano tecidual no local da inflamação. Um desequilíbrio entre a produção de radical de oxigênio pelas células fagocitárias na lesão periapical e a sua eliminação pode contribuir para o dano periapical e perda de osso na periodontite apical crônica (CROSS et al., 1987).

3.4.6 Gelatinase – Citolisinas

A gelatinase é uma metaloprotease extracelular de *E. faecalis*, que contém zinco na sua composição. A principal função das proteases bacterianas é prover nutrientes aos microrganismos, podendo causar danos direta ou indiretamente aos tecidos do hospedeiro sendo, por esta razão, consideradas como um fator de virulência de *E. faecalis*. A presença da gelatinase pode agravar uma infecção por *E. faecalis* em modelo animal, porém ela não é necessária para causar a doença (PORTENIER et al., 2003).

Citolisina, formalmente conhecida por hemolisina, é expressa por várias cepas de *E. faecalis*, sendo mais frequentemente uma toxina codificada no plasmídeo, que no seu cromossoma. É produzida por *E. faecalis* beta-hemolíticos. Entre as células alvo da citolisina estão os eritrócitos, PMNs e macrófagos, levando à redução da fagocitose. Integram um largo espectro de microrganismos Gram-positivos, mas não Gram-negativos, sendo que aumentos na quantidade de citolisina são produzidos sob condições de anaerobiose. Do ponto de vista endodôntico, este achado é importante, uma vez que as células do *E. faecalis* podem encontrar condições anaeróbicas no SCR e nos biofilmes, mediadas pelo consumo do oxigênio pelos aeróbios. (KAYAOGLU e ØRSTAVIK, 2002).

3.4.7 *E. faecalis* e os túbulos dentinários

E. faecalis pode invadir eficientemente os túbulos dentinários (HAAPASALO e ØRSTAVIK, 1987), colonizando e reinfetando CR obturados. Para isso, as células de *E. faecalis* contam com a capacidade de se adaptarem ao suprimento nutricional precário que favorece seu crescimento. Os fatores de virulência próprios de *E. faecalis*, a habilidade de competir com outras células bacterianas e alterar a resposta do hospedeiro e do ambiente, permitem que esta invasão ocorra, (HASE e FINKELSTEIN, 1993).

Recentemente, foi estabelecido, que a invasão dos túbulos dentinários está associada à adesão das células de *E. faecalis* à grande quantidade de colágeno constituinte dos túbulos e à resposta ao crescimento bacteriano induzido

por esta proteína (LOVE et al., 1997). Os mesmos autores demonstraram em 2001, que o excesso de colágeno induziu, competitivamente, a invasão celular, comprovando que a invasão bacteriana está associada com o colágeno desmineralizado dos túbulos dentinários. O estudo ainda comprova que a presença de soro leva a significativa diminuição da adesão das células de enterococos ao colágeno desmineralizado. No entanto, a presença de soro no meio de crescimento não preveniu a invasão de *E. faecalis* aos túbulos dentinários, nem inibiu a sua adesão ao colágeno imobilizado. Ao contrário, um número significativamente maior de células aderiram ao colágeno sugerindo um efeito sinérgico entre o soro e as células de enterococos (LOVE et al, 1997).

3.4.8 Interações *E. faecalis* e outras bactérias – Formação de Biofilme

Infecções dos CR são, geralmente, compostas por microbiota diversa que representam comunidades organizadas em biofilmes nas suas paredes. Tais comunidades polimicrobianas são bem adaptadas para a transferência horizontal de genes, provendo aos patógenos rápidas condições de adaptação pela aquisição de genes que codificam a resistência à antimicrobianos (Nair et al., 2005). As infecções persistentes do CR foram significativamente relacionadas com a identificação de *Streptococcus* spp, mais comumente *S. gordinii*, e *Enterococcus* spp. (SEDGLEY e CLEWELL, 2004).

A transferência conjugativa de plasmídeos é enriquecida nos biofilmes, onde as condições ambientais variam, resultando em alterações fenotípicas que facilitam sobrevivência e aumentam a virulência do microrganismo (SORENSEN et al., 2005).

A co-agregação é a adesão célula-célula de espécies bacterianas diferentes, visando o estabelecimento e a manutenção do biofilme (Kolenbrander, 2000). É altamente específica, envolvendo a interação de uma proteína de adesão e um carboidrato receptor, podendo ocorrer na saliva, considerando que a saliva inibe o crescimento de *Porphyromonas gingivalis* na presença de *Streptococcus*

sanguis e *Streptococcus gordinii*. A co-agregação interbacteriana específica tem influência direta na etiologia das doenças endodônticas. *P. gingivalis*, por exemplo, podem invadir os túbulos dentinários colonizados com *S. gordinii*, mas não na presença de *S. mutans* (JOHNSON et al., 2006).

E. faecalis endodôntico isolado pode coagregar-se com o *Fusobacterium nucleatum* mas não com o *Peptostreptococcus anaerobius*, *Prevotella oralis*, e *Streptococcus anginosus*, combinações associadas com a periodontite apical em ratos. Tanto *Streptococcus* spp. quanto *Enterococos faecalis* podem ser isolados em canais infectados, não há registros da interação entre estas duas espécies no ambiente do CR (SEDGLEY et al., 2005). É concebível que cepas endodônticas contenham plasmídeos conjugativos ou transposons, com genes que poderiam aumentar a virulência e serem transferidos a outras espécies durante ou após o tratamento endodôntico. (SEDGLEY et al., 2008).

Sedgley et al. (2004) mostraram que a co-agregação *E. faecalis* e *F. nucleatum* resultou na produção de gelatinase, hemolisina, e AS, bem como na múltipla resistência à antimicrobianos. Estas características fenotípicas foram também detectadas em isolados de *E. faecalis* recuperados de pacientes com endocardite bacteriana. Johnson et al.,(2006) investigaram interações de co-agregação entre *E. faecalis* e espécies que previamente se mostraram capazes de sobreviver e induzir a periodontite apical em macacos, mostrando que a co-agregação entre *E. faecalis* e *F. nucleatum* tem o papel potencial nas infecções endodônticas

Existem diferentes mecanismos utilizados pela bactéria que a permitem adaptar-se ao ambiente. A formação do biofilme, a modificação fisiológica, a resposta ao estresse, e a criação de subpopulações de células são mecanismos adaptativos utilizados por meio dos quais está envolvida a troca de material genético entre elas. A exploração destes mecanismos pode auxiliar na compreensão da sobrevivência da bactéria em ambientes limitados, como o CR. Um dos modelos de adaptação mais relevantes para a bactéria da cavidade oral é o de adesão à superfícies, que leva a formação de biofilmes servindo, não apenas

para auxiliar na sua fixação na cavidade oral, como também para o aumento de sua sobrevivência (CHAVES DE PAZ, 2007).

Investigações com base na ocorrência do *E. faecalis* nos CR obturados com lesões periapicais apresentaram um percentual de prevalência de 24% a 77%, com capacidade de aderir-se às paredes dos CR, acumular-se e formar comunidades organizadas em biofilme. Uma vez em comunidade, este microrganismo adquire a habilidade de tornar-se cerca de 1000 vezes mais resistente à fagocitose, anticorpos e antimicrobianos, que os organismos não organizados em biofilmes. A maior mudança ambiental induzida pelo tratamento do CR está relacionada com a redução de nutrientes e oxigênio. Por esta razão o estado fisiológico das células bacterianas no CR, particularmente nos retratamentos, está próximo da falta de nutrientes. (LIU et al., 2010).

O estilo de crescimento bacteriano no biofilme é uma espécie de adaptação onde a comunidade de microrganismos torna-se absorvida por uma superfície sólida e é embebida numa matriz. Muitos microrganismos aderem-se a essa superfície formando uma fina película. Esta matriz constitui 85% do volume do biofilme (PORTENIER et al., 2003). Esta matriz de substâncias poliméricas extracelulares é produzida pelas próprias células bacterianas, sendo que, as mais profundas são expostas a condições ambientais, como decréscimo da tensão de oxigênio, resultando em fenótipos alterados em termos de níveis de crescimento e transcrição de genes, o que pode facilitar certas características de sobrevivência e fatores de virulência (CATE, 2006).

Sunde et al. (2002), avaliando a microflora das periodontites apicais refratárias ao tratamento endodôntico afirmaram que o baixo nível do metabolismo das células sedentárias das camadas mais profundas do biofilme torna-as menos susceptíveis às substâncias antibióticas, por estarem mais bem estruturadas e produzirem menos proteínas que serviriam de alvo para os antibióticos convencionais.

As condições em que os biofilmes ocorrem nos CR infectados, *in vivo*, não estão bem esclarecidas. Os biofilmes foram encontrados, por exemplo, nas porções não instrumentadas do SCR, como no terço apical seccionado nas cirurgias parendodônticas. Kishen e George, (2006) sugeriram que a persistência do *E. faecalis* após o tratamento endodôntico pode estar associada com a sua capacidade de induzir a reprecipitação da apatita em biofilmes desenvolvidos

Chaves de Paz et al. (2007) afirmam que durante as várias fases de desenvolvimento e secções do biofilme, as células estão em diferentes estágios fisiológicos. As que se encontram na base, podem estar mortas ou lesadas, enquanto que as mais próximas da superfície, em crescimento ativo. Entretanto, mesmo com esta diversidade fisiológica, pode-se sugerir que, no biofilme, as células estão no “status” equivalente à fase estacionária de crescimento, mantendo baixa atividade metabólica, suficiente para provocar e persistir inflamação.

Nair *et al.* (2005) propuseram que a formação do biofilme nos CR inicia-se algum tempo após a primeira invasão da câmara pulpar por microrganismos orais planctônicos, após alguma ruptura de tecido. Neste estágio, a frente inflamatória, move sucessivamente em direção ao ápice e provê veículo fluido para facilitar a invasão dos microrganismos, que se multiplicam perpetuando o ataque às paredes do CR. Esta observação explica como a lesão inflamatória inicial serve como uma fonte de fluido para o deslocamento da bactéria do biofilme e a colonização de outros sítios inacessíveis dos CR.

Quatro mecanismos conferem tolerância das células organizadas em biofilmes: primeiramente as propriedades de barreira das enzimas da matriz extracelular, tais como as β - lactamases que se acumulam e se concentram na matriz, inativando a ação dos antibióticos β - lactâmicos. O segundo mecanismo envolve o estado fisiológico do microrganismo organizado em biofilme que cresce mais lentamente que aqueles em estado planctônico; como resultado as células em biofilme degradam os agentes antimicrobianos mais lentamente. O terceiro mecanismo sugerido, responsável pela tolerância antimicrobiana, afirma que o

microrganismo organizado em biofilme experimenta um metabolismo heterogêneo. Vários estudos mostram que o oxigênio pode ser completamente depletado pelas células da superfície do biofilme formando nichos anaeróbios para camadas mais profundas da comunidade. Alguns antibióticos, tais como aminoglicosídeos são mais efetivos contra bactérias que crescem em condições aeróbicas, assim, nem todas as células organizadas em biofilme serão afetadas da mesma maneira. Finalmente, foi recentemente sugerido que existe uma sub-população de microrganismos persistentes no biofilme, que constitui uma pequena porcentagem da população original, caracterizada pelo estado de alta resistência fenotípica, que resiste à eliminação pelos agentes antimicrobianos, (DUNAVANT et al., 2007).

3.5 Modulação da Resposta Imune do Hospedeiro - Processo Inflamatório

Infecção endodôntica é a infecção do CR, e a bactéria o agente etiológico primário das diferentes formas de doenças inflamatórias perirradiculares. O processo patológico tem início quando a polpa torna-se necrótica, usualmente por sequela de cárie, e então, é infectada por microrganismos que habitam a cavidade oral. O CR contendo a polpa necrótica provê aos microrganismos um ambiente úmido, aquecido, nutritivo, e protegido contra defesas do hospedeiro, estimulando a colonização e multiplicação microbiana. Após estabelecida a infecção endodôntica, os microrganismos entram em contato com os tecidos perirradiculares via forame apical e foraminas ocasionais, causando danos a estes tecidos, como reabsorção e necrose (ERICKSEN et al., 2002).

Os neutrófilos polimorfonucleares (PMNs) são componentes críticos da resposta imune do hospedeiro contra infecções bacterianas. As bactérias que invadem são opsonizadas pelas proteínas do sistema do complemento ou pelos anticorpos e subsequentemente, fagocitadas e mortas pelos PMNs. Os mecanismos imunológicos potenciais desencadeados por infecções enterocócicas são mediados pela ação neutrofílica sobre este microrganismo, primariamente ao complemento, com os anticorpos exercendo um papel de menor importância. A lise das células bacterianas mediada pelo complexo de ataque à membrana pode

não ter importância na resposta do hospedeiro em razão da ausência da membrana externa nas bactérias Gram-positivas (HARVEY et al., 1992).

A bactéria é opsonizada principalmente pelo terceiro componente do complemento (iC3b) e o fagócito liga-se a estas moléculas pelo receptor CR3. Os PMNs ativados, pela formação de um fagossomo, fagocitam a bactéria e a mesma será degradada. Tem-se mostrado que a AS enterocócica intervém na fagocitose bacteriana opsonino-independente por neutrófilos humanos. Entretanto, a presença de AS na parede celular de enterococos confere à bactéria resistência à degradação pelos macrófagos (PORTENIER et al., 2003).

3.6 Resistência a Antimicrobianos Sistêmicos

A utilização de antibióticos sistêmicos não faz parte da rotina do tratamento das periodontites apicais, ao contrário, são raramente utilizados na endodontia. A tentativa de minimizar riscos de sintomatologia pós-operatória tem sido um argumento frequentemente utilizado quando da prescrição de antibiótico em endodontia. O uso dos antibióticos sistêmicos não tem auxiliado na redução da incidência de quadros agudos (*flare-ups*), após o início do tratamento, como também não há evidência científica de que a terapia antibiótica sistêmica tenha efeito benéfico no prognóstico, em longo prazo, do tratamento das periodontites apicais. Existe um consenso atual na endodontia que antibióticos sistêmicos deveriam ser administrados apenas quando o quadro geral os indicam (Fouad AF, 2002), como nos casos de infecção grave associada febre, indicando que os mecanismos de defesa do hospedeiro estão comprometidos. Sendo assim, o foco é direcionado para as medidas antimicrobianas locais, como o preparo químico-mecânico e a desinfecção do SCR (SIQUEIRA JR., 2002).

O efeito dos antibióticos sistêmicos sobre *E. faecalis* no SCR é supostamente pequeno, uma vez que este microrganismo não está vinculado às infecções severas oriundas do CR. Não há estudos clínicos que demonstrem a efetividade de antibióticos sistêmicos nas infecções endodônticas por enterococos. Contudo,

como enterococos é um agente etiológico comum da endocardite bacteriana, a susceptibilidade antibiótica de enterococos endodônticos é de interesse.

Enterococos são resistentes aos nitromidazóis e o efeito da clindamicina contra os enterococos é conhecidamente fraco, (MURRAY BE., 1990). Nenhuma cepa resistente a vancomicina foi registrada em infecções endodônticas, e os resultados com outros antimicrobianos, tais como ampicilina e benzilpenicilina, têm sido variáveis.

Molander e Dahlén (2003) registraram um bom efeito anti-enterocóccico, *in vivo*, pela utilização local da associação hidróxido de cálcio/eritromicina, com 26 das 27 cepas de *Enterococcus* spp. eliminadas dos CR durante o tratamento. Contudo, esta associação de medicamentos teve um efeito menor contra as outras bactérias presentes no SCR. Dahlén et al., (2000) demonstraram a resistência de *E. faecalis* a benzilpenicilina, ampicilina, clindamicina, metronidazol, e tetraciclina e a sensibilidade a eritromicina e vancomicina. Tais diferenças podem estar ligadas ao tipo de cepa de *E. faecalis*, ao protocolo do tratamento, e a natureza da infecção endodôntica (infecção primária ou secundária).

Dados limitados em relação ao papel de diferentes bactérias durante as falhas na terapia endodôntica indicam que bactérias Gram-positivas podem ser mais importantes na periodontite apical persistente do que nas infecções primárias. Em geral, bactérias anaeróbias facultativas são consideravelmente mais difíceis de ser eliminadas dos CR infectados por serem menos susceptíveis à medicação antimicrobiana. O sucesso da terapia endodôntica depende do sucesso no controle da infecção. Caso as bactérias sejam resistentes à terapia ou aos mecanismos de defesa do hospedeiro, e possam sobreviver dentro do SCR invadindo continuamente o periodonto, a cura da lesão periapical estará comprometida (HANCOCK et al., 2001).

3.7 Ecologia - Estado Fisiológico da Bactéria

O estado fisiológico da bactéria tem influência no resultado do tratamento antimicrobiano. Portenier et al. (2005) mostraram que bactérias em falta de nutrientes tornam-se mais resistentes aos diferentes tipos de estresses que as células bacterianas em crescimento.

Embora as visões tradicionais sugiram que microrganismos que sobrevivem ao tratamento do CR seja um seletivo grupo estruturalmente “mais robustos”, parâmetros ecológicos indicam que a sobrevivência bacteriana após o tratamento do CR depende do quão bem eles se adaptam aos novos fatores limitantes no nicho correspondente. Além disso, como em todo microambiente natural, as capacidades adaptativas de um organismo são aumentadas exponencialmente quando este cresce em comunidade organizada em biofilme. Os fundamentos para a visão ecológica da infecção endodôntica sugerem que o patógeno mais perigoso não é uma única espécie, mas uma entidade polimicrobiana que se submete a mudanças genéticas e fisiológicas impostas pelas mudanças no ambiente do CR (CHAVES DE PAZ, 2007).

A fase de crescimento exponencial de *E. faecalis* é caracterizada microscopicamente por células organizadas em cadeias longas. A fase estacionária ou fase de não-crescimento, induzida pela falta de glicose, é um estado comum da existência natural dos microrganismos no qual a bactéria desenvolve diferentes estratégias procurando contornar a precariedade de nutrientes. Com o aumento da falta de nutrientes, o tamanho da célula diminui, chegando a um tamanho mínimo caso este prazo se prolongue. Na transição da fase de crescimento para a fase estacionária o índice de síntese molecular é reduzido (CHAVES DE PAZ, 2007).

Chaves de Paz (2007) identificou grupos de células persistentes, associadas a uma nova população em crescimento em meio de cultura, após exposição letal a antibióticos. O autor sugere que as células persistentes foram protegidas em alguma parte do ciclo celular, permanecendo em estado estacionário, com capacidade de iniciar a morte celular programada em resposta a um estímulo,

bem como, iniciarem uma nova sub-população, com susceptibilidade normal, quando o efeito antimicrobiano for dissipado (CHAVES DE PAZ, 2007).

A fase de falta de nutrientes ocorre entre 3 a 7 semanas de condições oligotróficas quando o *E. faecalis* desenvolve uma superfície celular encrespada, com formas irregulares e a ruptura do invólucro pode ser detectada em algumas células. Nesta fase, as células se organizam aos pares, as cadeias longas raramente podem ser detectadas. Para cada tipo de estresse existe um tempo específico requerido para a bactéria alcançar a resistência máxima (CHAVES DE PAZ 2007).

3.8. Tratamento do Sistema de Canais Radiculares – Soluções Irrigadoras

O estudo clássico de Kakehashi sobre *germ-free* (Kakehashi et al., 1965), feito em cães, mostra que lesões periapicais curam espontaneamente após a preparação de canal radicular sem qualquer obturação desde que a cavidade de acesso seja corretamente selada. Foi também demonstrado que nenhuma inflamação periapical ocorre na ausência de bactéria, independente da qualidade da obturação do CR. Assim, a completa eliminação da bactéria intracanal é um pré-requisito da obturação do canal para se alcançar o sucesso do tratamento endodôntico (SABETE et al., 2006).

As infecções endodônticas primárias são causadas por microrganismos orais, que são usualmente patógenos oportunistas que podem invadir o CR necrótico e estabelecer um processo infeccioso. O número de bactérias anaeróbias facultativas aumenta quando o CR permanece infectado por longos períodos de tempo, como o exemplo de *E. faecalis* que é mais frequentemente cultivado nos casos endodônticos crônicos, sendo o principal componente da microbiota de CR previamente tratados e com periodontite apical crônica (PROBBAKAR et al., 2010).

A limpeza mecânica do CR pode não ser suficiente para garantir uma desinfecção apropriada, mesmo executando preparações apicais finais mais

amplas, estas apenas reduzem o número de bactérias intracanal. A limpeza químico-mecânica com solução salina não permite a eliminação de patógenos endodônticos. Isto leva a concluir que a solução irrigadora intracanal deve apresentar propriedades antibacterianas quando associada com a preparação mecânica (Camps et al., 2009). Além de exibir atividade antimicrobiana, uma solução irrigadora endodôntica deve dissolver tecidos orgânicos e debris remanescentes da instrumentação do CR, prover lubrificação e não apresentar efeitos citotóxicos nos tecidos perirradiculares (VIANNA et al., 2004).

A preparação químico-mecânica de canais infectados tem como objetivo a completa eliminação da população bacteriana intracanal ou, pelo menos, a sua redução a níveis compatíveis com a cicatrização do tecido perirradicular. Bactérias que persistem, após procedimentos químico-mecânicos, em níveis detectáveis por técnica de cultivo, podem influenciar negativamente no resultado do tratamento. Sendo assim, os esforços devem ser direcionados no estabelecimento de protocolos que promovam culturas negativas. Vários estudos demonstram a incidência de culturas negativas de 40%-60% dos casos, após preparação químico-mecânica, utilizando diferentes técnicas de instrumentação e irrigação com diferentes tipos de soluções (BRITO et al., 2009).

3.8.1. Clorexidina (CHX)

O maior interesse na endodontia pela utilização da clorexidina como agente de desinfecção dos CR ocorreu a partir da ineficiência do hidróxido de cálcio contra algumas cepas de microrganismos, e dos frequentes isolamentos das mesmas nos casos de insucesso endodôntico, determinando a busca por novas alternativas de substâncias desinfetantes (DELGADO et al., 2010).

A CHX contém 1,6-bis-p-clorofenilbiguanidohexano catiônico com capacidade de atravessar a parede celular ou membrana externa, presumivelmente por difusão passiva, e atingir a membrana interna e o citoplasma bacteriano exercendo o seu efeito tóxico pela indução da produção de espécies

reativas de oxigênio, como óxido nítrico, que pode inibir o crescimento de *E. faecalis* por destruição das suas estruturas celulares (DELGADO et al., 2010).

Em baixas concentrações, a CHX é bacteriostática, enquanto que em altas concentrações induz a precipitação e coagulação dos constituintes celulares, resultando em efeito bactericida. Além do efeito antibacteriano imediato, a CHX confere substantividade antimicrobiana à dentina, propriedade catiônica que permite a esta substância se ligar à hidroxiapatita do esmalte e da dentina, bem como a grupos aniônicos ácidos de glicoproteínas, sendo lentamente liberada para o ambiente, à medida que a sua concentração no meio decresce, permitindo um tempo de atuação prolongado. É uma excelente substância química auxiliar, podendo ser utilizada na forma líquida ou gel, não apresentando toxicidade para os tecidos periapicais, e não possui a propriedade de dissolução de tecidos orgânicos, importante nos casos de polpas necrosadas (VALERA et al., 2010).

Viana et al. (2004) e Gomes et al. (2004) propuseram duas formulações para o uso da CHX, a líquida e o gel. Os resultados dos estudos são variados, mas demonstram que a atividade antimicrobiana da CHX líquida é igual ou superior ao gel quando envolve o contato direto. A formulação gel, entretanto, favorece a instrumentação, lubrificando a luz do CR e melhorando a capacidade dos instrumentos em eliminar tecidos orgânicos, já que esta substância não apresenta esta propriedade. Outra vantagem da CHX gel é a diminuição da formação de *smear layer*, o que não acontece com a CHX líquida.

Vianna et al., (2004) investigaram a atividade antimicrobiana de CHX gel e líquida nas concentrações de 0.2%, 1% e 2% contra *E. faecalis*, *C. albicans*, *S. aureus*, *P. gingivalis*, *P. endodontalis*, *P. intermédia* por diferentes períodos de tempo: 15, 30 e 45 segundos; 1, 3, 5, 10, 15, 20, e 30 minutos; e 1 e 2 horas. Os autores observaram que a CHX líquida 0.2% e CHX gel 0.2%, por 1 minuto ou menos, foram eficientes na eliminação dos microrganismos testados. O irrigante menos efetivo foi CHX gel 0.2% levando 2 horas e *E. faecalis* foi o microrganismo mais resistente ..

A cetrimida é um surfactante catiônico que tem demonstrado, além da atividade bactericida, a capacidade de diminuir a estabilidade mecânica do biofilme. Seu uso no tratamento do CR é frequentemente associado com outras soluções irrigadoras. A combinação de cetrimida e CHX tem exibido alta atividade antimicrobiana contra *E. faecalis* planctônicos. Contudo, até então, esta atividade, isolada ou associada com CHX, na erradicação de *E. faecalis* organizados em biofilmes necessita de ensaios com diferentes tempos de exposição (ARRIAS-MOLIZ et al. 2010)

3.8.2 Hipoclorito de Sódio

Hipoclorito de sódio (NaOCl) é a solução irrigadora mais frequentemente utilizada devido a sua efetiva ação antimicrobiana, apresentando excelente habilidade de dissolução de tecido orgânico quando utilizada em concentrações \geq 0.5%. As principais vantagens do NaOCl, além da sua habilidade de dissolver tecidos necróticos, somam o amplo espectro de atividade antimicrobiana, ação lubrificante facilitando a instrumentação, ausência de descoloração do dente tratado, baixo custo e fácil disponibilidade. Entretanto, dentre as inconveniências primárias na utilização deste químico, destaca-se a sua toxicidade e o potencial para resposta inflamatória severa se injetada nos tecidos perirradiculares, principalmente, quando utilizada em altas concentrações. Grande número de estudos apontam a inabilidade desta solução em erradicar completamente as bactérias dos canais infectados, independente da concentração e do tempo de aplicação, o péssimo odor e sabor, o potencial para causar corrosão, e a conhecida capacidade de desencadear reação alérgica (SHABAHAN et al., 2008).

O NaOCl está disponível comercialmente em concentrações que variam de 0.5% a 5.25%. A solução em baixa concentração é inefetiva contra microrganismos específicos, como *E. faecalis*, enquanto que em concentrações elevadas apresenta o inconveniente da baixa biocompatibilidade causando inflamação periapical (ØRSTAVIK e HAAPASSALO, 1990).

A eficiência desinfetante do NaOCl depende da concentração do ácido hipocloroso (HClO) não dissociado na solução, que exerce seu efeito germicida pela oxidação do grupo sulfidril constituinte das enzimas bacterianas. Como as enzimas bacterianas essenciais são inibidas, reações metabólicas importantes são rompidas, resultando na morte da célula. Entretanto, *E. faecalis* são resistentes ao NaOCl, especialmente em baixas concentrações. A concentração de uma solução de NaOCl comercial representa sua concentração em termos de cloro disponível. Uma vez que, o ácido hipocloroso (HClO) é um ácido fraco, o cloro disponível na solução de NaOCl adquire várias formas químicas de acordo com o pH, sendo: Cl₂ a forma ácida; HClO a forma neutra; ClO⁻ a forma alcalina. O tamponamento das soluções de NaOCl para aumentar a eficiência foi desenvolvido pelo Dr Henry Drysdale Dakin durante a Primeira Guerra Mundial para o tratamento de gangrena gasosa. Algumas propriedades de soluções de NaOCl tamponadas já foram exploradas por endodontistas, concluindo-se que a concentração de HClO de uma solução de NaOCl com pH 7.5 é duas vezes maior que com pH 9, o que eleva, teoricamente as propriedades antimicrobianas da solução. Por outro lado, a diminuição do pH para 6.5 e 7.5 de uma solução de NaOCl 4.2% aumentou estatisticamente a efetividade antibacteriana contra *Enterococcus faecalis* em dentes infectados artificialmente (CAMPS et al., 2010).

3.8.3 MTAD - Biopure MTAD® (Dentsply Maillefer Tulsa OK, EUA)

A primeira investigação sobre o MTAD foi publicada em 2003 por Torabinejad et al.. Estes autores introduziram no Mercado o Biopure MTAD® uma solução que contém em sua composição doxiciclina a 3%, ácido cítrico a 4.25% e um detergente, o *Tween 80*. Utilizada para irrigação dos CR, após o uso da solução de NaOCl durante o preparo químico-mecânico, com o objetivo de aprimorar a limpeza e desinfecção da dentina radicular.

Esta solução tem se mostrado eficiente na remoção da camada residual, com mínimas alterações erosivas na superfície dentinária. É um material biocompatível com efeitos solubilizadores na polpa e na dentina, comparáveis ao

EDTA. A maior diferença entre Biopure MTAD® e EDTA é uma alta afinidade de adesão da doxiciclina presente no Biopure MTAD® permitindo um efeito antibacteriano estendido. Segundo alguns autores, quando utilizada em conjunto com a solução de NaOCl 1.3%, apresenta atividade antimicrobiana superior à associação NaOCl 5.25% e EDTA 17%. Contudo, outros autores comprovam que o MTAD® apresenta ação antifúngica deficiente, incapacidade de eliminação do biofilme bacteriano, além de poder provocar alteração de cor no tecido dentinário, (DE DEUS et al., 2007).

E.D.T.A (ácido etilenodiaminotetracético) é um produto amplamente utilizado no preparo das paredes dos canais radiculares, previamente à obturação. Atua desmineralizando partículas dentinárias por quelação de íons de cálcio e magnésio, facilitando sua dissolução e absorção, mostrando-se como um efetivo agente quelante e lubrificante. É também efetivo na remoção de raspas dentinárias durante a terapia endodôntica, expondo o colágeno e facilitando a aderência do tecido conjuntivo tratado na superfície radicular. Este composto descalcifica a dentina a uma profundidade de 10 a 30 µm em 5 minutos. A sua solubilidade chega a 30% e o seu pH entre 7,0 e 8,0 é compatível com os tecidos vivos, conferindo ao produto uma irritação tecidual praticamente nula. EDTA também apresenta atividade antibacteriana, mas a sua propriedade mais importante é a remoção da “*smear layer*” (SCHIRRMESTER et al., 2007)

Tetraclean (Ogna Laboratori Farmaceutici, Milão, Itália) é uma mistura de hialato de doxiciclina 1%, concentração mais baixa que no MTAD (3%), com ácido cítrico 10%, concentração mais alta que MTAD (4.25%) e a cetrimida, um detergente na concentração de 0.2%, em concentração mais baixa que o Tween 80 (0.5%) do MTAD. Esta formulação tem apresentado baixos valores de tensão superficial, auxiliando sua adaptação às paredes dentinárias e ao biofilme. Tem também mostrado boa atividade antimicrobiana quando utilizada contra bactérias planctônicas, especialmente contra cepas de *E. faecalis* (GIARDINO et al., 2007).

4. Objetivos

4.1 Objetivo Geral

Revisar os diversos estudos que avaliam a atividade anti-enterocócica das soluções de hipoclorito de sódio e clorexidina, nas diversas concentrações disponíveis, e de BioPure MTAD®.

4.2 Objetivos Específicos

- Conhecer as características morfológicas e fisiológicas de *Enterococcus faecalis*.
 - Verificar seus fatores de virulência característicos de *E. faecalis*.
 - Conhecer a relação entre *E. faecalis* e o hospedeiro.
 - Pesquisar a resistência de *E. faecalis* frente a antibióticos sistêmicos.
- Observar a importância da formação de biofilme para o desenvolvimento da doença endodôntica.
 - Conhecer os vários métodos de identificação de *E. faecalis*.
 - Verificar a atividade das soluções irrigadoras sobre *E. faecalis*.

5. Metodologia

Para este estudo comparativo foi processado um levantamento das publicações atualizadas sobre o grau de importância das soluções irrigadoras propostas, suas concentrações, mecanismos e tempo de ação, indicações, contra-indicações, bem como, uma avaliação da utilização de combinações das mesmas em diferentes concentrações e tempos de uso.

Toda literatura foi pesquisada em periódicos com grau de impacto considerável, buscando a relevância dos resultados apresentados. As fontes de informação utilizadas para esta revisão foram os sites da internet: PERIODICOS CAPES (<http://www.periodicos.capes.gov.br/portugues/index.jsp>) e MEDLINE (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubMed>).

O critério de inclusão dos artigos utilizados nesta revisão baseou-se na aplicabilidade da metodologia utilizada, buscando o emprego de novos conceitos e das novas soluções testadas na clínica diária. Trabalhos clássicos da literatura endodôntica, que justificam conceitos utilizados atualmente foram também incluídos e excluídos os estudos comparativos de outras soluções diferentes daquelas propostas nesta revisão.

6. Resultados e Discussão

Vários estudos indicam que a prevalência de *E. faecalis* é pequena nas infecções endodônticas primárias e alta nas infecções persistentes. *E. faecalis* é o mais comum e ocasionalmente a única bactéria isolada dos canais radiculares de dentes com periodontite apical persistente. Embora, com seus vários fatores de virulência e sua inerente resistência antimicrobiana, a habilidade de causar doença perirradicular baseia-se na capacidade de tolerar os efeitos do tratamento do CR, de se adaptar às mudanças ambientais locais e persistir como patógeno no CR e nos túbulos dentinários. Desta forma, endodontia enfrenta o desafio de encontrar métodos que eliminem efetivamente este microrganismo durante e após a terapia do CR. Atualmente, a utilização de boas técnicas de anti-sepsia incluindo a utilização de soluções irrigadoras eficientes, como, NaOCl, CHX e MTAD são os métodos mais efetivos na eliminação de *E. faecalis* do SCR.

6.1. Discussão dos Resultados Relacionados com NaOCl e CHX

A presença de microrganismos nos CR é um fator chave para o desenvolvimento de lesões periapicais. A complexa anatomia do SCR (NAIR et al., 2005; SOARES et al., 2010) a localização difusa das infecções endodônticas, a ação da dentina na redução da atividade dos agentes antissépticos, a relativa difusibilidade dos agentes antimicrobianos, a formação do biofilme, e a relativa resistência antimicrobiana das bactérias infectantes impedem a completa eliminação dos microrganismos nos sítios endodônticos pelos regimes de anti-sepsia intracanal utilizados corriqueiramente (Portenier et al., 2006; Molander et al., 1998). Considerando que a persistência bacteriana tem um grande impacto

nos resultados dos tratamentos endodônticos, por impedir a cicatrização dos tecidos apicais, torna-se relevante a utilização de terapêuticas capazes de controlá-la efetivamente (SIQUEIRA et al., 2005).

Dentre os procedimentos envolvidos no controle e colonizações bacterianas do CR, a irrigação é um importante processo na eliminação de microrganismos. Os diferentes protocolos de tratamento propostos na atualidade buscam vencer as dificuldades de obtenção da esterilização do SCR por meio da utilização de novas substâncias com propriedades biológicas e físico-químicas efetivas na desinfecção da dentina e remoção da *smear layer*, promovendo a abertura dos túbulos dentinários para permitir a penetração do agente antimicrobiano e manter a sua ação antimicrobiana (TORABINEJAD et al., 2003).

A habilidade de promover efetivamente a limpeza do espaço endodôntico depende tanto da instrumentação, quanto da irrigação por meios químico-mecânicos. As soluções irrigadoras utilizadas durante a limpeza e formatação do SCR exercem um papel essencial no sucesso de desbridamento e desinfecção (TORABINEJAD et al., 2003).

A prevalência de *E. faecalis* é mais elevada nas amostras de saliva de pacientes que receberam tratamento e retratamento endodôntico, comparadas àquelas que não apresentam história endodôntica. *E. faecalis* é encontrado em 4-40% das infecções endodônticas primárias (Roças et al., 2004). Entretanto, nas lesões perirradiculares persistentes demonstra uma prevalência nove vezes maior, por possuir fatores de virulência, os quais conferem habilidade de sobrevivência e persistência como um patógeno dos CR, com capacidade de resistir a longos períodos sem nutrição adequada. É um microrganismo anaeróbio facultativo relativamente fácil de ser cultivado e com alta relevância clínica. Esta bactéria apresenta considerável resistência a substâncias químicas auxiliares e medicações comumente utilizadas na endodontia, (SEDGLEY et al., 2004).

Shirrmeister et al., (2007) verificaram a eficácia de diferentes regimes de irrigação com NaOCl 2,5%, EDTA 17%, CHX 2% e hidróxido de cálcio (Ca(OH)₂),

na erradicação microrganismos em canais obturados e com lesões apicais. As avaliações quantitativas pela contagem de CFUs e PCR mostraram que prevalência de *E. faecalis* foi de 60% e 65% respectivamente Após a preparação dos canais e irrigação com NaOCl associado a EDTA nenhum microrganismo foi detectado. Assim, clorexidina e Ca(OH)_2 podem não ter apresentado uma desinfecção efetiva, concluindo que a preparação e a irrigação apropriadas do CR utilizando NaOCl e EDTA são suficientes para a descontaminação dos CR durante o retratamento endodôntico.

As infecções dos CR têm natureza diferente daquelas que ocorrem nas cáries ou periodontites porque elas se estabelecem em compartimentos originalmente estéreis, o que levou ao conceito de que a etiologia das infecções dos CR envolve apenas um único patógeno. Recentemente, a frequente recuperação de *E. faecalis* em CR associados a infecções persistentes despertou intenso interesse sobre esta bactéria. *E. faecalis* se tornou o microrganismo ideal para testar diferentes irrigantes, medicamentos e soluções antissépticas utilizadas em endodontia, cujos achados revelam sua resistência inata (PORTENIER et al, 2006). O extenso interesse em *E. faecalis* resultou da sua habilidade de crescimento sob quase todas as condições laboratoriais, resultando no conceito que este organismo é o agente etiológico único das infecções endodônticas crônicas, (CHAVES DE PAZ et al., 2007).

Kishen et al., (2008) estudaram os efeitos de soluções endodônticas irrigadoras na aderência de *E. faecalis* à dentina, utilizando 100 dentes unirradiculados divididos em 7 grupos: grupo 1 (não tratados – controle); grupo 2 (tratados com EDTA 5 mmol/L por 5 minutos e NaOCl 5,2% por 30 minutos); grupo 3 (tratados com NaOCl 5,2% por 30 minutos e EDTA 5 mmol/L por 5 minutos); grupo 4 (tratados com NaOCl 5,2% por 30 minutos, EDTA 17% por 5 minutos, e NaOCl 5,2% por 30 minutos); grupo 5 (tratados com NaOCl 5,2% por 30 minutos, EDTA 17% por 5 minutos, e CHX 2% por 30 minutos); grupo 6 (tratados com EDTA 17% por 5 minutos, NaOCl 5,2% por 30 minutos, e CHX 2% por 30 minutos); grupo 7 (tratados com CHX 2% por 30 minutos). Os resultados indicaram que houve significativo aumento na aderência e na força de adesão após irrigação da dentina

com EDTA. Com o uso de CHX houve aumento da força de adesão e redução do número de bactérias aderidas. O regime de irrigação do grupo 6 (EDTA, NaOCl e CHX) resultou no mais baixo número de células de *E. faecalis* aderidas. O tratamento final com CHX produziu a máxima redução de células aderidas à dentina (19%-28%). Se a irrigação intermediária com NaOCl não fosse utilizada, a aderência bacteriana produzida pela irrigação com EDTA não seria significativamente reduzida pela irrigação final com CHX. O estudo enfatiza que substâncias químicas que alteram as propriedades físico-químicas da dentina, influenciam na aderência, força de adesão e conseqüentemente na formação do biofilme de *E. faecalis*.

Tervit et al., (2010) avaliaram a proporção de cura de dentes com periodontite apical medicados com clorexidina líquida a 2%, pelo acompanhamento de 22 pacientes submetidos ao tratamento endodôntico de pré-molares unirradiculares (n = 17) e anteriores (n = 5) com evidência radiográfica de periodontite apical. Os autores utilizaram, como protocolo de irrigação, a solução de hipoclorito de sódio 2,5% e clorexidina 2% por 7-15 dias. Amostras bacterianas foram colhidas antes e após a instrumentação, após a medicação e antes da obturação dos canais. Após 2 a 4 anos os pacientes foram submetidos a exames clínicos e radiográficos, 16 dos 17 (94%) dos dentes com periodontite apical foram considerados como cicatrizados após realizado os tratamentos endodônticos utilizando CHX líquida 2%.

Valera et al., (2010) avaliando a atividade antimicrobiana do NaOCl 2,5% e da CHX 2,0% (líquida e gel), verificaram a formação do precipitado sólido escuro, resultante da combinação entre NaOCl e CHX na entrada dos túbulos dentinários e aderido às paredes dentinárias, agindo como uma *smear layer*, interferindo no bom selamento marginal do material obturador e favorecendo a infiltração. Basrani et al., (2007) também concluíram que o NaOCl, em concentração mínima (0,023%), quanto associado a CHX 2%, induziu a formação imediata de precipitado e mudança de coloração, explicando que a CHX é um ácido dicatiônico (pH 5,5-6,0) com habilidade de doar prótons, enquanto que o NaOCl, alcalino, é capaz de receber prótons. Esta troca de prótons resulta na formação

deste precipitado neutro. Assim, clinicamente, torna-se necessário a completa remoção do NaOCl antes da aplicação de CHX. Valera et al., (2010) utilizaram o soro fisiológico e verificaram a formação de precipitado apenas nas entradas dos túbulos dentinários, concluindo que a CHX líquida não dissolve debrís dentinários, permitindo a penetração da *smear layer* no interior dos túbulos. Akisue et al., (2010) utilizaram ácido cítrico 15% na lavagem do NaOCl considerando a capacidade desmineralizadora e a adequada biocompatibilidade da solução, sem interferir nas propriedades da CHX. Este estudo verificou que a associação NaOCl com CHX é viável, desde que a instrumentação seja iniciada com irrigação com NaOCl, seguida pelo soro fisiológico ou água destilada, limitando a irrigação com CHX gel apenas aos instrumentos finais.

O elevado índice de redução bacteriana detectado por Soares et al., (2010) pode ser atribuído a volumes maiores de irrigantes e a natureza química das soluções. A estratégia de uso da irrigação alternada com NaOCl e EDTA maximizou a efetividade dos antissépticos promovendo uma completa descontaminação, observada desde o 5º dia, por um extenso período pós-instrumentação. O grupo controle: irrigação com solução salina 0.85% manteve uma estabilidade de valores de CFU/mL, sugerindo que a bactéria atingiu o estágio estacionário de crescimento, enquanto que o grupo C1: irrigação com NaOCl, seguida por EDTA e finalizada com NaOCl, após significativa redução da densidade bacteriana, permitiu parcial recolonização detectada no 5º dia. Todos os grupos experimentais apresentaram baixos níveis de crescimento microbiano ao 13º dia, indicando que a recolonização não ocorreu em grande extensão, influenciada pela inviabilidade de nutrientes associada com mínima atividade metabólica. Os achados sugerem um sinergismo entre NaOCl e EDTA, favorecido pelo seu uso alternado promovendo um maior efeito bactericida e/ou interferindo com o processo de recolonização. Por esta razão, o regime de irrigação alternada parece ser uma escolha valiosa na terapêutica clínica.

A perda de cloro disponível e o pH da solução de NaOCl 2,5% neutralizada foram os parâmetros utilizados por Camps et al., (2009) para determinar o prazo de validade, a capacidade de dissolução de tecido e a atividade antibacteriana

desta solução. A neutralização do NaOCl 10% com 0,2 mol/L de HCl produziu o NaOCl 2,5%, que necessita ser utilizado, no máximo, 2 horas após manipulado. Esta solução modificada foi tão eficiente na dissolução da polpa dental quanto a solução de NaOCl 2,5% não modificada, durante os primeiros 5 minutos de contato, apresentando melhor atividade antimicrobiana contra *E. faecalis*. Este estudo mostrou que as soluções de Dakin (NaOCl 0,5%); NaOCl 2,5% neutralizada e NaOCl não modificada dissolveram 2,25, 3,25 e 5,0 mg/mL/min respectivamente, afirmando que a capacidade de dissolução das soluções de NaOCl aumenta com o conteúdo de cloro, razão pela qual a solução de Dakin foi a menos efetiva. Este resultado foi o esperado, uma vez que, já foi demonstrado que a citotoxicidade da solução de NaOCl, bem como seus efeitos antimicrobianos, aumentam com a concentração. Embora nenhuma das soluções utilizadas no estudo foram eficientes na eliminação de 100% de bactéria, a solução de NaOCl 2,5% neutralizada apresentou melhor efeito antimicrobiano que a solução de NaOCl 2,5% não modificada.

Camps et al., (2010) concordam com Vianna et al., (2003) quando afirmaram que atividade antimicrobiana da solução de NaOCl depende da concentração de ácido hipocloroso (HClO) não dissociado na solução, exercendo efeito germicida pela da oxidação do grupo sulfidríla das enzimas bacterianas. Uma vez que estas enzimas essenciais são inibidas, reações metabólicas importantes são interrompidas resultando na morte da célula bacteriana. Os autores recomendam CHX como alternativa para o NaOCl pela biocompatibilidade, afirmando que o efeito da CHX está relacionado com a adesão da molécula catiônica com a parede celular bacteriana carregada negativamente, alterando assim o equilíbrio osmótico. Acrescentam, ainda, que a CHX em formulação líquida é efetiva contra um vasto número de bactérias, mesmo em concentrações muito baixas. O estudo apresentado mostra que CHX 2,0% em formulação gel ou líquida, e NaOCl 5,25% tiveram o mesmo comportamento antimicrobiano contra todos os microrganismos testados, porem, a CHX 2,0% é menos tóxica, não apresentando o odor desagradável do NaOCl 0,5% e inibe a atividade antimicrobiana por um período superior a 72 horas. A formulação CHX gel 0,2%, por ser de difícil miscibilidade, impede o contato direto com as células bacterianas, requerendo, então, maior

tempo de ação contra o microrganismo. Neste estudo, verificou-se que foram necessárias 2 horas para eliminação do *E. faecalis*. Todas as soluções irrigadoras testadas apresentaram atividade antimicrobiana de acordo com a concentração, forma apresentada e susceptibilidade microbiana.

O tempo mínimo de aplicação de NaOCl 5,25% requerido para eliminação de *E. faecalis*, em torno de 5 minutos, foi determinado com base no estudo de Shabahang et al., (2008) enquanto que o tempo máximo de irrigação, determinado no estudo de Relamozo et al., (2010) foi de 25 minutos, quando não se verificou turbidez na amostra tratada com NaOCl 5,25%. Estes resultados estão de acordo com aqueles encontrados por Siqueira & Roças (2002) mostrando dificuldade na eliminação de *E. faecalis* que utilizaram NaOCl nas concentrações de 1%, 2,5% e 5,25%, alcançando uma significativa redução bacteriana mas não alcançaram a completa eliminação. Shabahang et al., mostraram que a irrigação com NaOCl 1,3% e 5,25% falhou em eliminar consistentemente esta bactéria. Resultados de estudos anteriores mostram completa eliminação de *E. faecalis* em curtos tempos de exposição ao NaOCl. Haapasalo et al., (2000) afirmaram que em ausência de raspas de dentina, NaOCl elimina *E. faecalis* em menos de 5 minutos. Gomes et al., (2004) verificaram inibição de crescimento com NaOCl 0.5% após 30 minutos de contato e reduziram este tempo para menos que 30 segundos utilizando NaOCl 5.25%. Diferenças encontradas entre os estudos e a presente investigação estão mais ligadas aos efeitos inibitórios da dentina e falhas de instrumentação que limitam o contato da solução irrigadora com o microrganismo alojado no interior dos túbulos dentinários.

Arias-Moliz et al., (2010) investigaram a eficácia antimicrobiana das soluções irrigadoras de cetrimida (1% a 0,0019%) e clorexidina (4% a 0,078%) por 30 segundos, 1 minuto e 2 minutos, utilizadas na combinação de diluições de 1:1 e de forma alternada. A cetrimida erradicou biofilmes de *E. faecalis* nas concentrações de 0,5%, 0,0312%, e 0,078% em 30 segundos, 1 minuto e 2 minutos de contato, respectivamente, enquanto que a CHX não erradicou biofilmes em nenhuma das concentrações e tempos de prova. A aplicação de cetrimida 0,1% ou 0,05%, combinadas ou alternadas, erradicou 100% de biofilmes

nos 3 tempos de ensaio. A erradicação foi também verificada quando utilizada cetrimida nas concentrações de 0,02% e 0,01% por 2 minutos.

Os achados de Arias-Moliz et al., (2010) são consistentes com aqueles encontrados por Abdullah et al., (2005); Portenier et al., (2006); Dunavant et al., (2006) que comprovam a necessidade de associar CHX à cetrimida, um surfactante catiônico que diminui a irritação e a tensão superficial de líquidos, facilitando a sua penetração nas áreas de difícil acesso. Estes achados sugerem que a cetrimida enfraquece as forças coesivas, rompendo a matriz exopolissacarídica (EPS) responsável pela estabilidade e adesão mecânica do biofilme. O uso alternado da cetrimida e CHX demonstrou uma porcentagem de redução significativamente maior que aquela encontrada quando ambas foram utilizadas em combinação. O uso prévio de cetrimida facilita a desestruturação da matriz EPS e a atividade da CHX. De acordo com o protocolo apresentado neste estudo, os resultados sugerem que a aplicação da associação cetrimida/CHX apresenta maior eficácia que quando utilizadas isoladamente.

Os efeitos dos antimicrobianos: Alkali (pH 12); CHX 12,5%; EDTA 50 mM e NaOCl 1%, contra *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus paracasei*, *Streptococcus anginosus* e *Streptococcus gordini* organizados em biofilme, foram avaliados quanto ao seus efeitos sobre a integridade da membrana, a atividade metabólica e a estrutura do biofilme. A remoção efetiva de células do biofilme foi observada após tratamento com NaOCl para todos microrganismos testados. EDTA e Alkali apresentaram resultados similares na quebra da estrutura polimérica da matriz do biofilme. Contudo o efeito da CHX não foi abrangente para o biovolume dos biofilmes organizados pelo *L. paracasei* e *E. faecalis*, atingindo apenas as células das camadas mais superficiais. As variações de efeitos apresentados pelas soluções podem ser explicadas por uma seleção de células bacterianas que aderem, exclusivamente, nos fracos traços hidrofóbicos criados pela oxidação da superfície, na interface colágeno-substrato. Contudo, o modelo de biofilme preparado para este estudo foi sensível, apresentando diferenças na integridade da membrana e na remoção das células do biofilme expostas às soluções testadas (CHAVES DE PAZ et al., 2010).

Chaves de Paz et al., (2010) utilizaram microscopia para analisar respostas de biofilmes e a influência do revestimento superficial de colágeno sob a ação do pH alcalino das soluções de CHX 2,5%, EDTA 50 mmol/L e NaOCl 1,0%,. Para a investigação os autores utilizaram cepas de *E. faecalis*, *Lactobacillus paracasei*, *Streptococcus anginosus* e *Streptococcus gordini* isoladas de pacientes que apresentaram infecção periapical persistente. Foram também analisados os efeitos das soluções irrigadoras na arquitetura do biofilme e na extensão de revestimento da superfície do substrato com colágeno. NaOCl 1% foi a solução que mais afetou a integridade da membrana de todos os microrganismos testados, além de remover maior número de células dos biofilmes. EDTA afetou a integridade da membrana de todos organismos testados mas removeu pouca quantidade de células dos biofilmes de *E. faecalis*, *L. paracasei* e *S. anginosus*. CHX 2,5% apresentou efeito brando na integridade da membrana de *E. faecalis*, e removeu apenas 50% da células dos biofilmes. Os efeitos apresentados foram substrato dependente e a maioria dos organismos apresentaram aumento da resistência aos antimicrobianos testados quando na presença de substrato revestido de colágeno.

Relamozo et al., (2010) investigaram a concentração de NaOCl e o tempo de irrigação requerido para a desinfecção de 450 cilindros de dentina bovina infectados com *E. faecalis*, divididos em três grupos (n = 15) de concentrações NaOCl 1,3%, 2,5% ou 5,25%, aplicadas nos intervalos de 5-,10-,15-, 20-, 25-, 30-, 35-, 40- minutos, incluindo um grupo controle positivo com 15 cilindros. A ausência de turbidez demonstrou a falta de crescimento bacteriano, enquanto que a turbidez indicou a presença de remanescentes bacterianos viáveis. Todos os controles positivos apresentaram turbidez. O protocolo de irrigação mais efetivo foi NaOCl 5,25% por 40 minutos, enquanto que a irrigação com NaOCl 1.3% e 2.5%, no mesmo intervalo de tempo foram inefetivos na remoção de *E. faecalis* dos cilindros de dentina. Os investigadores concluíram que altas concentrações e longo tempo de exposição ao NaOCl são necessários para a eliminação de *E. faecalis* da dentina contaminada.

Soares et al., (2010) avaliaram a efetividade antimicrobiana do uso alternado de NaOCl e EDTA, na eliminação de *E. faecalis*, durante o preparo químico-mecânico, utilizando 38 dentes unirradiculares humanos divididos segundo o seguinte regime: grupo controle (n = 12) 1 ml de solução salina; grupo Cl (n = 12) 1 ml NaOCl 5,25% , 1 ml EDTA 17% e 1 ml de NaOCl; grupo Al (n = 12) NaOCl/EDTA/NaOCl combinados, sendo que o volume de irrigantes foi o mesmo para os outros grupos. Após concluídas as irrigações, foram tomadas amostras em três fases: antes do tratamento (S1), após o preparo químico-mecânico (S2) e após 14 dias (S3). Todos os canais do grupo S1 foram contaminados, apresentando *smear layer* e remanescentes de biofilme obliterando orifícios tubulares. Microrganismos residuais nos orifícios dos túbulos foram observados no grupo Cl, enquanto que o grupo Al apresentou erosão de dentina peritubular e muitos sítios livres de infecção. Os investigadores concluíram que o regime de irrigação alternado de NaOCl e EDTA é uma ferramenta endodôntica promissora na eliminação do biofilme de *E. faecalis*.

Akisue et al., (2010) compararam o efeito do uso combinado de NaOCl e CHX com ácido cítrico (AC) e CHX na permeabilidade da dentina, testando a hipótese de que o precipitado formado pela associação de NaOCl com CHX pudesse afetar os resultados. Para o estudo foram utilizados 34 dentes anteriores, aleatoriamente divididos em: grupo 1 (controle positivo sem irrigação); grupo 2 (irrigação com AC e CHX 2% solução); grupo 3 (irrigação com NaOCl 1% e CHX 2% solução), As médias de penetração de precipitado não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos, quando avaliadas nos terços cervical e médio. No nível apical, entretanto, as diferenças entre os grupos controle positivo e grupo NaOCl + CHX, e entre AC + CHX e NaOCl + CHX, foram observadas. NaOCl 1% e solução de clorexidina 2% resultaram na formação de um precipitado floculado, agindo como uma *smear layer* química que reduz a permeabilidade no terço apical.

6.2. Discussão dos Resultados Referentes a MTAD

Shabahang e Torabinejad (2003) compararam o efeito antimicrobiano *in vitro* do MTAD e do NaOCl, com ou sem EDTA. Os autores utilizaram o NaOCl nas concentrações de 1,3% ou 5,25% durante o preparo químico-mecânico, como solução irrigadora, em seguida, os CR e a superfície radicular externa foram expostos a aplicação de MTAD por 5 minutos, NaOCl 1,3%, NaOCl 5,25%, ou a aplicação de EDTA seguida da irrigação com NaOCl 1,3% ou com NaOCl a 5,25%. Os resultados da investigação consideram a utilização de NaOCl 1,3% como irrigadora do CR e o MTAD, como solução irrigadora final o tratamento mais efetivo contra o *E. faecalis*, que os outros regimes terapêuticos.

Torabinejad et al., (2003) investigaram os efeitos de várias concentrações de NaOCl, antes do uso de MTAD, como solução irrigadora final, para remoção da *smear layer*, utilizando 80 dentes humanos extraídos divididos em dois grupos controle (n = 5): grupo A controle positivo (água destilada); grupo B controle negativo (NaOCl 5,25% + EDTA 17%), e sete grupos experimentais (n = 10): grupo C (NaOCl 5,25% + NaOCl 5,25%); grupo D (água destilada + MTAD); grupo E (MTAD + MTAD); grupo F (NaOCl 0,65% + MTAD); grupo G (NaOCl 1,3% + MTAD); grupo H (NaOCl 2,6% + MTAD) e grupo I (NaOCl 5,25% + MTAD). Após o protocolo de instrumentação e irrigação, os espécimes foram examinadas por MEV, quanto a presença ou ausência de “*smear layer*” e a quantidade de erosão nas superfícies das paredes dos CR. Os resultados mostraram que embora o MTAD tenha removido a maior quantidade de “*smear layer*”, alguns remanescentes dos componentes orgânicos permaneceram aderidos às superfícies dentinárias. A efetividade do MTAD na completa remoção da *smear layer* é melhorada quando associada a baixas concentrações de NaOCl, antes do seu uso, sem alterar significativamente a estrutura dos túbulos dentinários

Ainda em 2003, Torabinejad et al., compararam as propriedades antimicrobianas do MTAD com NaOCl 5,25% e EDTA 17% na erradicação de *E. faecalis*. Quando as soluções não-diluídas foram testadas não houve diferenças estatisticamente significante entre NaOCl e MTAD. Com a diluição das soluções houve aumento dos halos de inibição promovidos pelo MTAD, sendo maiores que do NaOCl 5,25% e EDTA. Os resultados apresentados mostraram que o EDTA

não apresentou efeito sobre *E. faecalis*. NaOCl 5,25% manteve a ação antimicrobiana em diluições de até 32 vezes, enquanto que o MTAD sustentou a eficácia antimicrobiana até a diluição de 200 vezes. Além disso, o NaOCl não diluído ou diluído a 1:2, exposto de 2 e 5 minutos sobre *E. faecalis*, não resultou na erradicação total do microrganismo, enquanto que após os mesmos períodos de exposição e diluições, a cultura foi negativa para MTAD.

Dunavant et al., (2006) avaliaram a eficácia das soluções irrigadoras: NaOCl 1% e 6%; Smear Clear®; CHX 2%; REDTA e BioPure MTAD®, contra uma cepa de *E. faecalis* (OG1X). O efeito de cada solução testada foi determinado pela quantificação de células erradicadas em porcentagem em relação às células viáveis. Tanto o NaOCl 1% quanto 6% foram efetivos na erradicação de *E. faecalis* organizado em biofilme. Uma diferença estatisticamente significativa foi encontrada entre as concentrações de NaOCl testadas. De acordo com a metodologia utilizada, os autores concluíram que nas concentrações testadas de 6% > 99,99% e de 1% > 99,78%, foram mais eficazes na erradicação do biofilme de *E. faecalis* que as demais soluções irrigadoras testadas: SmearClear (78,06%); CHX 2% (60,49%); REDTA (26,99%); MTAD (16,08%).

Portenier et al., (2006) investigaram a atividade antimicrobiana do MTAD, CHX e CHX/Cetrimida sobre *E. faecalis* e os efeitos inibitórios da dentina e albumina do soro bovino (BSA). Tanto o MTAD 100% quanto CHX 0,2% eliminaram rapidamente as cepas de *E. faecalis*. A combinação CHX/Cetrimida foi ainda mais eficiente eliminando células bacterianas imediatamente após o contato apresentando, ainda, inibições similares à CHX pura, sendo mais sensível a albumina que a dentina. A dentina retardou a atividade antimicrobiana da CHX que também foi fortemente inibida pela presença de BSA. MTAD foi igualmente sensível a estas duas substâncias

Kho e Baumgartner, (2006) compararam a eficácia antimicrobiana de irrigação das associações NaOCl 1,3%/BioPure MTAD® e EDTA 17%/ NaOCl 5,25%. Foram utilizados, para a investigação, 50 pré-molares com canal único, sendo 40 espécimes do grupo experimental e 6 do controle positivo inoculados

com *E. faecalis* (ATCC 19433) e 4 espécimes do controle negativo não inoculados com a bactéria. Os espécimes foram aleatoriamente selecionados nos grupos A (NaOCl 5,25%/EDTA 15%); grupo B (NaOCl 1,3%/BioPure MTAD®) e grupo controle positivo (solução salina). Não houve diferença significativa na eficácia antimicrobiana entre os grupos A e B. A eficácia da irrigação com solução salina também não foi estatisticamente diferente dos grupos A e B.

De Deus et al., (2007) acessaram a habilidade desmineralizadora do BioPure MTAD®, comparando os resultados com aqueles obtidos com as soluções EDTA 17% e ácido cítrico 5%. Foram utilizados, para o estudo, 9 molares superiores humanos montados em cilindros de resina epóxica, nos quais foram feitos corte de discos de dentina com espessuras de $3 \pm 0,3$ mm aproximadamente e expostos às soluções testadas. Baseado no fenômeno da desmineralização e na quantidade de efeito de cada solução demonstrou-se que a desmineralização promovida pelo ácido cítrico e pelo BioPure MTAD® foi significativamente mais rápida que aquela promovida pelo EDTA

Vários estudos apontam o bom desempenho do MTAD como agente antibacteriano, contudo, o melhor efeito bactericida pode decorrer do efeito antibacteriano continuado da doxiciclina (*carry over*) na sua composição. Krause et al., (2007), em estudo, *ex vivo*, irrigaram raízes dentais contaminadas com *E. faecalis* com MTAD, coletaram as amostras que foram centrifugados em BHI e transferidas para outro meio recém-preparado, na intenção de minimizar o efeito *carry over*, para então serem colhidas novas amostras. Os resultados mostraram que a absorção da doxiciclina à dentina necessitou de no mínimo 160 minutos de aluição na água, para a interrupção do seu efeito. Neste estudo, os investigadores simplesmente preencheram o lumem das amostras, para simular uma situação mais próxima do uso clínico, e descobriram que o MTAD não foi mais efetivo que a solução salina. Ao examinar as propriedades dos quatro antimicrobianos testados, por meio do método de difusão em agar, os autores observaram que o NaOCl 5,25% foi menos efetivo em criar zonas de inibição que a doxiciclina e o MTAD em todas as diluições. A habilidade do NaOCl em denaturar proteínas pode ter afetado a difusibilidade e a propriedade bactericida na placa agar. Além disso, a

concentração de doxiciclina utilizada (10%) foi superior àquela encontrada no BioPure MTAD® (3%), explicando as maiores zonas de inibição produzidas pela doxiciclina. A concentração de doxiciclina nas soluções de MTAD provavelmente afeta a atividade antimicrobiana e a efetividade contra *E. faecalis*.

Os resultados apresentados na investigação de Shabahang et al., (2008) mostram claramente que a presença da doxiciclina na concentração incluída na formulação do MTAD é muito efetiva contra cepas clínicas de *E. faecalis*. Os autores afirmam que, a adição de CHX 0,2% não afetou adversamente a ação antimicrobiana da doxiciclina, mas a substituição da doxiciclina por CHX reduziu significativamente a eficácia do MTAD como agente antimicrobiano. Quando testadas separadamente, a efetividade da CHX 0,2%, obteve o percentual de eliminação de 50%. Eles explicam que o pH da CHX é de 5,5 e, mesmo que tenha ocorrido uma redução para 2,2 com a adição de ácido cítrico e Tween-80, não houve diferença significativa na eliminação de *E. faecalis*. Embora o ácido cítrico exerça, por si só, algum efeito antimicrobiano, ele não aumenta a eficácia da CHX. A concentração de CHX utilizada neste estudo foi de 0,2%, porque maiores concentrações (2%) são difíceis de serem mantidas na solução.

Giardino et al (2008) compararam a eficácia antimicrobiana das soluções de NaOCl 5,25%, BioPure MTAD® e Tetraclean contra *E. faecalis* organizados em biofilme, por períodos experimentais de 5, 30 e 60 minutos. Os resultados apontam que apenas o NaOCl 5,25% pode desagregar e remover o biofilme em todos os tempos testados. Tetraclean foi capaz de eliminar o biofilme após 60 minutos de contato, e sua capacidade de romper o biofilme foi estatisticamente melhor que o MTAD em todos os períodos experimentais. Os autores afirmam que quantidade de doxiciclina contida na solução BioPure MTAD® é três vezes superior que do Tetraclean, mas a sua menor atividade de desagregação do biofilme pode ser causada por efeitos sinérgicos dos diferentes componentes da sua formulação, e não devido à concentração do antibiótico.

Como visto nos resultados de outros estudos, Dunavant et al., (2006) mostrou que apenas NaOCl foi capaz de eliminar totalmente a população

bacteriana organizada em biofilme, e que esta atividade está estritamente ligada à sua concentração. Outros autores observaram que a porcentagem de eliminação de *E. faecalis* pelo BioPure MTAD® foi de apenas 16,8% e que estes achados podem estar relacionados com a atividade bacteriostática da doxiciclina. Kho e Baumgartner (2006) compararam a ação das associações NaOCl 1,3%/BioPure MTAD® com NaOCl 5,25%/EDTA 17% contra *E. faecalis* obtendo resultados semelhantes

Baumgartner e Marshall (2007) compararam o efeito antimicrobiano das associações NaOCl 1,3%/BioPure MTAD® e NaOCl 1,3%/EDTA 15% para irrigação dos CR. Os investigadores utilizaram para este estudo 46 dentes anteriores humanos divididos em dois grupos experimentais: Grupo A (n = 20) NaOCl 5,25%/EDTA 15%; Grupo B (n = 20) NaOCl 1,3%/MTAD: Grupo controle positivo (salina). As primeiras amostragem revelaram o crescimento de 0 dos 20 espécimes irrigados com NaOCl 5,25%/EDTA15% e 8 dos 20 espécimes irrigados com NaOCl 1,3%/BioPure MTAD®. Após o alargamento adicional crescimento foi de 0 dos 20 espécimes irrigados com NaOCl 5,25%/EDTA15% e de 10 dos 20 espécimes irrigados com NaOCl 1,3%/BioPure MTAD®, mostrando uma desinfecção consistente com NaOCl 5,25%/EDTA15%. A combinação de com NaOCl 1,3%/BioPure MTAD® deixou quase 50% dos canais contaminados com *E. faecalis*

Royal et al., (2007) compararam a efetividade do NaOCl 5,25%, MTAD® e CHX 2% na desinfecção dos materiais obturadores, Resilon® (Resilon Pentron Clinical Technologies LLC, Wallingford, EUA) e Guta-Percha (Obtura Spartan, Fenton, EUA). contaminados com *E. faecalis* e desinfetadas por irrigação com as soluções testadas por 1, 5, e 10 minutos. Após cada período experimental os espécimes foram secos, lavados em água esterilizada, e incubados a 37°C por 7 dias. Aos 1º, 3º e 7º dias os meios foram avaliados visualmente quanto a turbidez. Amostras de cada grupo experimental e controle foram escolhidas aleatoriamente, plaqueadas, incubadas a 37°C e observados o crescimento ao 3º e 7º dias. As três soluções irrigadoras testadas mostraram efetividade na rápida desinfecção das amostras de Resilon® e guta-percha na presença de *E. faecalis*.

Krause et al., (2007) compararam a eficácia antimicrobiana do BioPure MTAD® dois de seus componentes, doxiciclina (100 mg/ml de hidrato de doxiciclina) e ácido cítrico 10%, e NaOCl 5,25%, contra *E. faecalis* utilizando raspas de dentina bovina e difusão em agar. No primeiro teste, utilizando modelo de dentina bovina, a doxiciclina e NaOCl produziram o maior efeito antimicrobiano, sendo o NaOCl o mais efetivo nas camadas mais profundas. MTAD e ácido cítrico tiveram um comportamento similar à salina em ambas as profundidades. Para o modelo de difusão em agar a doxiciclina e o MTAD produziram maiores halos de inibição que o NaOCl.

Giardino et al., (2007) compararam a eficácia antimicrobiana do NaOCl 5.25%, BioPure MTAD® e Tetraclean (Ogna Laboratori Farmaceutici, Milão, Italia) contra cepas de *E. faecalis* ATCC 29212 organizado em biofilme gerados em filtros de membranas de celulose. Os resultados demonstraram que o NaOCl foi a única solução irrigadora capaz de remover o biofilme em todos os períodos experimentais. Os mesmos efeitos só foram alcançados pelo Tetraclean aos 60 minutos. A redução bacteriana por BioPure MTAD® não foi significativa após 5 minutos e em menores proporções aos 30 e 60 minutos.

Mohammadi et al., (2008) compararam a substantividade antibacteriana das soluções de BioPure MTAD®, CHX 2%, NaOCl 2,6% contra *E. faecalis* na dentina humana Para este estudo os autores utilizaram 50 raízes de dentes incisivos superiores humanos, cortados em blocos com 6 mm de diâmetro e 4 de espessura (n = 110), tratados com NaOCl 5,25% e EDTA 17%, infectados com *E. faecalis* ATCC 29212 e divididos aleatoriamente em 5 grupos de acordo com a solução irrigadora testada: G1 (n = 30) BioPure MTAD®; G2 (n = 30) CHX 2%; G3 (n = 30) NaOCl 2,6%; G4 (n = 10) controle positivo, tubos de dentina infectada; G5 (n = 10) controle negativo, tubos de dentina esterilizada. Os resultados mostraram que ao dia 0, o grupo NaOCl demonstrou maior efetividade de ação antibacteriana. Entretanto, nos dia 7, 14, 21 e 28, BioPure MTAD® demonstrou-se mais efetivo que as outras soluções irrigadoras testadas, expressando a habilidade do MTAD ser absorvido pela hidroxiapatita e liberado gradualmente em níveis terapêuticos.

Mohammadi e Shahiriari (2008) compararam as soluções de BioPure MTAD®CHX 2% e NaOCl 2.6% na dentina humana, quanto ao grau de penetração nos túbulos dentinários e a atividade antibacteriana. A solução de NaOCl 2,6% obteve a mais efetiva ação antibacteriana após o tratamento, mas esta atividade caiu rapidamente, indicando que a solução tem pouca ou nenhuma substantividade. Os autores explicam que a provável razão seja porque o NaOCl tem o seu efeito antimicrobiano em presença de cloro disponível na solução. O cloro não pode penetrar profundamente na dentina. Os valores médios de UFC estatisticamente menores apresentados pelo BioPureMTAD® em todos os tempos experimentais (0,7,14,21,e 28 dias), exceto no primeiro, reforçam a substantividade prolongada que é explicada pela presença do detergente Tween 80, na sua composição. O Tween 80 reduz a tensão superficial facilitando a penetração da solução nas camadas mais profundas da dentina. Nas condições apresentadas por este estudo, a substantividade do BioPure MTAD® foi significativamente mais elevada que da CHX, restando-se no CR por pelo menos 28 dias.

A substituição de doxiciclina por CHX na formulação de MTAD®, a adição da mesma e a verificação de um possível aumento na eficácia antimicrobiana contra cepas de *E. faecalis* foram verificadas por Shabahang et al., (2008). Para a investigação os autores utilizaram 50 dentes unirradiculares divididos nos seguintes grupos (n = 10): Controle negativo (água destilada); controle positivo (água destilada e autoclavagem); Grupo A (NaOCl 1,3% e MTAD®); Grupo B (NaOCl 1,3% e MCAD - clorexidina 0,2% em lugar de doxiciclina); Grupo C (MTAD-C - adição de clorexidina 0,2% à formulação). Todas as amostras do grupo controle positivo apresentaram turbidez, enquanto que as amostras do controle negativo permaneceram livres de germes. Nenhum dos 10 espécimes dos grupos A (MTAD®) e C (MTAD-C) apresentou turbidez em uma semana. Dos 10 espécimes irrigados com MCAD, sete apresentaram culturas positivas. Estes resultados mostraram claramente que a presença de doxiciclina na concentração incluída na formulação do MTAD® é muito efetiva contra cepas clínicas de *E.*

faecalis e que a substituição de doxiciclina por clorexidina diminui a atividade antimicrobiana do MTAD®.

Os efeitos antimicrobianos das soluções de BioPure MTAD®, Tetraclean, Cloreximida (mistura CHX e cetrimida), e NaOCl 5,25% foram testados contra *E. faecalis*, *Prophyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia*, por Giorgino et al., (2009). Todas as soluções testadas apresentaram atividade antimicrobiana contra *P. intermedia* e *P. gingivalis*, sendo que o NaOCl 5,25% apresentou a maior zona de inibição, ficando a menor para cloreximida. Quanto a ação das soluções testadas contra *E. faecalis*, a atividade do Tetraclean foi equivalente ao do BioPure MTAD® e superiores ao NaOCl 5,25% e Cloreximida. MTAD e Tetraclean apresentaram resultados similares por ambos conterem um mesmo antibiótico (doxiciclina), ácido cítrico e um detergente. Cloreximida apresentou o pior resultado contra todas as bactérias testadas, provavelmente pelo fato do estudo não ter considerado a propriedade de substantividade deste medicamento.

Pappen et al., (2010) investigaram, *in vitro*, a ação do Tetraclean, MTAD e cinco soluções irrigadoras experimentais (MTAD + cetrimida 0,01%; MTAD + cetrimida 0,1%, MTAC-1, MTAC-2, MTAD-D) contra *Enterococcus faecalis* em forma planctônica e em biofilme organizado em substrato de hidroxiapatita. Os experimentos em células planctônicas revelaram a remoção do Tween 80 do MTAD (MTAD-D) não apresentou diferença em relação ao biofilme. Entretanto, quando Tween 80 foi substituído por Cetrimida (CTR) a dinâmica de erradicação foi aumentada, indicando que Tween 80 pode inibir a atividade da CTR. A adição de CTR 0,1% resultou em acentuada erradicação de células planctônicas de *E. faecalis*. Portenier et al., (2006), Dunnavant et al.,(2006), Kho e Baumgartner (2006) e Krause et al., (2007) também descreveram a excelente atividade antimicrobiana da CTR quando associada a CHX e MTAD. Os testes feitos em biofilmes mostraram que, após 1 minuto de exposição, menos da metade dos microrganismos foram erradicados por todas as soluções testadas. Após 3 minutos, estas soluções erradicaram de 56-71% dos biofilmes. O presente estudo indica que os testes de erradicação de bactéria planctônica podem ser úteis para

uma visão preliminar de novos agentes desinfetantes antes de prosseguir com experimentos complexos.

7. Conclusões

- As soluções irrigadoras propostas e revisadas neste estudo apresentaram desempenho antimicrobiano, reduzindo significativamente a atividade do *E. faecalis* no SCR, embora nenhum estudo tenha apresentado completa eliminação do microrganismo.

- O tempo e a concentração da solução irrigadora de hipoclorito de sódio exercem um papel significativo na habilidade de eliminação de *E. faecalis* do SCR.

- A eficácia antimicrobiana da clorexidina nas formulações líquida ou gel, e nas suas diversas concentrações, somadas à atividade de substatividade, justificam o seu uso como solução irrigadora dos canais radiculares.

- A utilização de BioPure MTAD® como solução irrigadora final, associada ao hipoclorito de sódio 1,3% é um protocolo significativamente efetivo, tanto na remoção da “*smear layer*”, quanto na eliminação de *Enterococcus faecalis*.

- Antibióticos sistêmicos não apresentam efetividade nas infecções endodônticas promovidas por enterococos.

- A presença do biofilme no terço apical radicular é importante para a manutenção do processo inflamatório periapical.

- Tomando como referência os resultados apresentados nos estudos aqui revisados e a minha experiência clínica, hipoclorito de sódio na concentração de 5,25 %, seguido de EDTA é o protocolo de irrigação mais eficiente na eliminação de *E. faecalis* do SCR. Contudo, devido ao alto potencial de irritação tecidual, principalmente em alta concentração, o manuseio desta solução deve ser lento e cuidadoso.

8. Referências Bibliográficas

1. ABDULLAH M. **Susceptibilities of Two *E.f.* Phenotypes to Root Canal Medications.** J Endod 2005; n. 31: p. 30-6.
2. AKISUE E., TOMITA V.S., GAVINI G., FIGUEIREDO J.A.P. **Effect of Combination of Sodium Hypochlorite and Chlorhexidine on Dentinal Permeability and Scanning Electron Microscopy Precipitate Observation.** J Endod 2010; v. 36, n. 5: p. 847-850.
3. ARIAS-MOLIZ M.T., FERRER-LUQUE C.M., RODRIGUEZ M.P.G., VALDERRAMA M.J., BACA P. **Eradication of *Enterococcus faecalis* Biofilms by Cetrimide and Chlorhexidine.** J Endod 2010; v. 36, n. 1: p. 87-90.
4. ARCHIMBAUD C., SHANKAR N., FORESTIER C., BAGHDAYAN A., GILMORE M. S., CHARBONNE F. **In vitro Adhesive Properties and Virulence Factors of *Enterococcus faecalis* Strains.** Res Microbiol 2002; n. 153: p. 75-80.
5. BAIK J.E., RYU Y.H., HAN J.Y., IM J., KUM K., YUN C., LEE K., HAN S.H. **Lipoteichoic Acid Partially Contributes to the Inflammatory Responses to *Enterococcus faecalis*.** J Endod 2008; n. 34: p.975-82.
6. BASRANI B., TJÄDERHANE L., SANTOS J.M., PASCON E., GRAND H., LAWRENCE H.P., FRIEDMAN S. **Efficacy of Chlorhexidine and Calcium Hydroxide Containing Medicaments Against *Enterococcus faecalis* in vitro.** Oral surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2003; n. 96: p. 618-24.

7. BAUMGARTNER J.C., SIQUEIRA Jr J.F., XIS T., ROÇAS IN. **Geographical Differences in Bacteria Detected in Endodontic Infections Using Polymerase Chain Reaction.** J Endod 2004; n. 30: p. 141-4.

8. BAUMGARTNER J.C., MARSHALL J.G. **Comparison of the Antimicrobial Efficacy of 1.3% NaOCl/BioPure MTAD to 5.25% NaOCl/15% EDTA for Root Canal Irrigation.** J Endod 2007; v. 33, n. 1: p. 48-51.

9. BRITO P.R.R., SOUZA L.C., OLIVEIRA J.C.M., ALVES F. R.F., DeDEUS G., LOPES H.P., SIQUEIRA Jr J.F. **Comparison of the effectiveness of Three Irrigation Techniques in Reducing Intracanal *Enterococcus faecalis* Population: An *In Vitro* Study.** J Endod 2009; v. 35, n. 10: p. 1422-1427.

10. CAMPS J., POMMEL L., AUBUT V., VERHILLE B., SATOSHI F., LASCOLA B., ABOUT I., **Shelf life, Dissolving Action, and Antibacterial Activity of a Neutralized 2.5% Sodium Hypochlorite Solution.** Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2009; n. 108: p. e66-e73.

11. CATE JM. **Biofilms, a New Approach to the Microbiology of Dental Plaque.** Odontology 2006; n. 94: p.1-9

12. CHAVES DE PAZ L.C. **Redefining the persistent infection in root canal: possible role of biofilm communities.** J Endod 2007; v. 33: p. 652-62.

13. CHAVES DE PAZ L.C., BERGENHOLTZ G., SVENSÅTER G. **The Effects of Antimicrobials on Endodontic Biofilm Bacteria.** J Endod 2010; v. 36, n 1: p. 70-7

14. CLEWELL P.B., WEAVER K.E., **Sex Pheromones and Plasmid Transfer in *Enterococcus faecalis*.** Plasmid 1989; n. 21: p. 175-84.

15. CROSS C.E., HALLIWELL B., BORISH E.T., PRYOR W.A., AMES B.N., SAUL R.L., **Oxygen Radicals and Human Disease.** Ann Intern Med 1987; n 107: p. 526-45
16. DAHLEN G., SAMUELSSON W., MOLANDER A., REIT C. **Identification and Antimicrobial Susceptibility of Enterococci Isolated From the Root Canal.** Oral Microbiology and Immunology 2000; v. 15, n. 5: p. 309-12.
17. DE-DEUS G., REIS C., FIDEL S., FIDEL R., PACIORNIK S. **Dentin Demineralization When Subjected to BioPure MTAD: A Longitudinal and Quantitative Assessment.** J Endod 2007; v. 33, n. 11: p. 1364-68.
18. DUNAVANT T.R., REGAN J.D., GLICKMAN G.N., SOLOMON E.S., HONEYMAN A.L., **Comparative Evaluation of Endodontic Irrigants Against *E. faecalis*.** Biofilms J Endod 2006; n. 32: p. 527-31.
19. ERICKSEN H.M., KIRKEVANG L.L., PETERSSON K. **Endodontic Epidemiology and Treatment Outcome: General Considerations.** Endodontic topics 2002; n. 2: p. 1-9.
20. EVANS M. **Mechanisms Involved in the Resistance of *E. f.* to Calcium Hydroxide.** Int Endod J 2002; n. 35: p. 221-8.
21. FOUAD A.F. **Are Antibiotics Affective for Endodontic Pain? An Evidence-Based Review.** Endod Topics 2002: N. 3; P. 52-6.
22. FOUAD AF. **Molecular Detection of *E.f.* in Root Canals of Therapy-Resistant Endodontic Infections.** Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2005; n. 99; p.112-8.
23. GEORGE S., KISHEN A. **Effect of Tissue Fluids on Hydrophobicity and Adherence of *Enterococcus faecalis* to Dentin.** J Endod 2007; n 12, v. 33: p. 1421-24.

24. GIARDINO L., AMBU E., SAVOLDI E., RIMONDINI R., CASSANELLI C., DEBBIA E.A. **Comparative Evaluation of Antimicrobial Efficacy of Sodium Hypochlorite, MTAD, and Tetraclean Against *Enterococcus faecalis* Biofilm.** J Endod 2007; v. 33, n. 7: p. 852-55.
25. GIARDINO L., SAVOLDI E., AMBU E., RIMONDINI R., PALEZONA A., DEBBIA E.A. **Antimicrobial Effect of MTAD, Tetraclean, Cloreximid and Sodium Hypochlorite on Three Common Endodontic Pathogens.** Indian J Dent Res 2009; n. 20, v. 3: p. e12-16.
26. GIARDI J.C., HARTKE A, FLAHAUT S., BENACHOU A., BOUTIBONNES P., AULFRAY Y. **Starvation-Induced Multiresistance in *Enterococcus faecalis* JH2-2.** Current Microbiology 1996; v. 32: p. 264-71.
27. GOMES B.P., PINHEIRO E.T., GADE-NETO C.R., SOUZA E.L., FERRAZ C.C ZAIA A.A. **Microbiological Examination of Infected Dental Root Canals.** Oral Microbiol Immunol 2004: n 19; p. 71-6.
28. GOMES-FILHO J.E., AURÉLIO KG., DE MORAIS COSTA M.M.T., BERNABE P.F.E. **Comparison of the Biocompatibility of Different Root Canal Irrigants.** J Appl Oral Sci 2008; n. 16: p. 137-44
29. HAAPASALO M., SIREN EK., WALTIMOTM., ØRSTAVIK D., HAAPASALO MP. **Inactivation of Local Root Canal Medicaments by Dentine: An In Vitro Study.** Int Endod J 2000; v. 33: p 126-31.
30. HANCOCK H.H.I., SIRGUDSSON A.D., TROPE M.B., MOISEIWITSSCH J.B. **Bacteria Isolated After Unsuccessful Endodontic Treatment in North American Populations (Miscellaneous)** Oral Surg Oral Med Oral Pathol, Oral Radiol Endod 2001: n. 91: p. 579-86.

31. HARVEY B.S., BACKER C.J., EDWARDS M.S. **Contributions of Complement and Immunoglobulin to Neutrophil-mediated Killing of Enterococci.** Infect Immun 1992; n. 60: p. 3635-40.
32. HIENZ S. A., SCHENNINGS T., HEIMDAHL A., FLOCK J. I. **Collagen Binding of *Staphylococcus aureus* Is a Virulence Factor in Experimental Endocarditis.** J Infect Dis 1996; n. 174: p. 83-8.
33. JECKINSON H.F. **Streptococcus Adhesion and Colonization.** Critical Reviews in Oral Biology and Medicine 1997; v. 8, p. 175-200.
34. JOHNSON E.M., FLANNAGAN M.A., SEDGLEY C.M. **Coaggregation Interactions Between Oral and Endodontic *Enterococcus faecalis* and Bacterial Species Isolated from Persistent Apical Periodontitis.** J Endod 2006; v. 32, n. 10: p. 946-50.
35. KAYAOGLU G., ØRSTARVIK D. **Virulence Factors of *Enterococcus faecalis*: Relationship to Endodontic Disease.** Crit Rev Oral Biol Med 2004; v. 15: n.5, p 308-320.
36. KHO P., BAUMGARTNER C. **A Comparison of the Antimicrobial Efficacy of NaOCl/BioPure MTAD versus NaOCl/EDTA against *Enterococcus faecalis*.** J Endod 2006; v. 32, n. 7: p. 652-55.
37. KISHEN A. S., GEORGE. R. K. ***E. f.* Mediated Biomineralized Biofilm Formation on Root Canal Dentine in vitro.** J Biomed Mater Res - Part A. 2006; n. 77: v. 2; p. 406-15.
38. KISHEN A, SUM C.P., MATHEW S., LIM C.T. **Influence of Irrigation Regimens on the Adherence of *Enterococcus faecalis* to Root Canal Dentin.** J. Endon 2008; v. 34: n. 7, p. 850-54.

39. KOLENBRANDER P.E. **Oral Microbial Communities: Biofilms, Interactions, and Genetic Systems.** Annu Rev Microbiol 2000; n. 54: p. 413-37.
40. KRAUSE T.A., LIEWEBR F.R., HABN C-L. **The Antimicrobial Effect of MTAD, Sodium Hypochlorite, Doxycycline, and Citric Acid on *Enterococcus faecalis*.** J Endod 2007; v. 33, n. 1: p. 28-30.
41. LEE W., LIM S., SON H.H., BAE K.S. **Sonicated Extract of *Enterococcus faecalis* Induces Irreversible Cell Cycle Arrest in Phytohemagglutinin-activated Human Lymphocytes.** J Endod 2004; n. 30: p. 209-12.
42. LOVE R.M. ***Enterococcus faecalis* – A Mechanism for Its Role in Endodontic Failure.** Int Endod J 2001; n. 34: p. 399-405.
43. MOHAMMADI Z., **Evaluation of Residual Antibacterial Activity of Three Concentrations of New Canal Irrigation Solution.** NYSDJ 2008; n. 74: p. 31-3.
44. MOHAMMADI Z., SHAHRIARI S. **Residual Antibacterial Activity of Chlorexidine and MTAD in Human Root Dentin *in vitro*.** J Oral Sci 2008; v. 50 n. 1: p. 63-7.
45. MOLANDER A., REIT C., DAHLEN G., KVIST T. **Microbiological Status of Root- filled Teeth With Apical Periodontitis.** Int Endod J 1998; n. 31: p.1-7.
46. MURRAY B.E. **The Life and Times of the *Enterococcus*.** Clin Microbiol Rev 1990; n. 3: p. 46-65.
47. NAIR P.N., HENRY S., CANO V., VERA J., **Microbial Status of Apical Root Canal System of Human Mandibular First Molars with Primary Apical Periodontitis After “One Visit” Endodontic Treatment.** Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2005; n. 99: p. 231-52.

48. ØRSTAVIK D., HAAPASALO M. **Desinfection by Endodontic Irrigants and Dressings of Experimentally Infected Dentinal Tubules.** Endod Dent Traumatol 1990; n. 6: p. 142-9.
49. PAPPEN F.G., SHEN Y., QIAN W., LEONARDO M.R., GIARDINO L., HAAPASALO M., **In Vitro Antimicrobial Action of Tetraclean, MTAD and Five Experimental Irrigation Solution.** Int Endo J 2010; n. 43: p. 528-35.
50. PINHEIRO E.T., GOMES B.P., FERRAZ C.C, SOUZA E.L., TEIXEIRA F.B., SOUZA FILHO F.J. **Microorganisms From Canals of Root-filled Teeth With Periapical Lesions.** Int Endod J. 2003; n. 36; p. 1-11.
51. PORTENIER I., WALTIMO T.M.T., HAAPASALO. M. ***Enterococcus faecalis* – The Root Canal Survivor and ‘Star’ in Post-Treatment Disease.** Endodontic Topics 2003; v. 6: p. 135-59.
52. PORTENIER I., WALTIMO T.M.T., ØRSTAVIK D., HAAPASALO. M. **Killing of *Enterococcus faecalis* by MTAD and Chlorhexidine Digluconate With or Without Cetrimide in the Presence or Absence of Dentine Powder or BSA.** J Endod 2006; v. 32, n. 2: p. 138-41.
53. PROBBAKAR J., SENTBILKUMAR M., PRIYA M.S., MABALASKSBMI K., SEBGAL P.K., SUKUMARAN V.G. **Evaluation of Antimicrobial Efficacy of Herbal Alternatives (Triphala and Green Tea Polyphenols), MTAD, and 5% Sodium Hypochlorite against *Enterococcus faecalis* Biofilm Formed on Tooth Substrate; An *In Vitro* Study.** J Endod 2010; v. 36, n. 1: p. 83-86.
54. RAKITA R. M., VANEK N. M., JACQUES-PALAZ K., MEE M., MARISCALCO M. M., DUNNY G. M. ***Enterococcus faecalis* Bearing Aggregation Substance is Resistant to Killing by Human Neutrophils Despite Phagocytosis and Neutrophil Activation.** Infect Immun 1999; n. 67: p. 6067-75.

55. RELAMOZO B., SHABROKD S., JOHNSON N., APRECIO R.A., TORABINEJAD M. **Minimum Contact Time and Concentration of Sodium Hypochlorite Required to Eliminate *Enterococcus faecalis***. J Endod 2010; v. 36, n. 3: p. 520-23.
56. ROÇAS I.N. **Polimerase Chain Reaction Identification of Microorganisms in Previously Root-Filled Teeth in South Korean Population**. J Endod 2004; n. 30: p. 504-508.
57. ROYAL M., WILLIAMSON E., DRAKE D.R. **Comparison of 5.25% Sodium Hypochlorite, MTAD, and 2% Chlorhexidine in the Rapid Disinfection of Polycaprolactone- Based Root Canal Filling Material**. J Endod 2007: v. 33, n. 1: p. 42-4.
58. SCHÄFER E., BÖSSMANN K. **Antimicrobial Efficacy of Chlorhexidine and Two Calcium Hydroxide Formulations Against *Enterococcus faecalis***. J Endod 2005; v. 31, n. 1: p. 53-6.
59. SCHLIEVERT P.M., GAHR P.J., ASSIMCOPOULOS A.P., DINGES M.M., STOEHR J.A., HARMALA J.W. **Aggregation Binding Substances Enhance Pathogenicity in Rabbit Models of *Enterococcus faecalis* Endocarditis**. Infect Immun 1998; n. 66: p. 218-23.
60. SEDGLEY C.M., CLEWELL D.B. **Bacterial Plasmids in the Oral and Endodontic Microflora**. Endodontic topics 2004; n. 9: 3 p. 37-51.
61. SEDGLEY C.M., MOLANDER A., FLANNAGAN S.E. **Virulence, Phenotype, Genotype Characteristics of Endodontic *Enterococcus* ssp**. Oral Microbiol Immunol 2005; n. 20: p. 10-9.
62. SEDGLEY C.M. **Survival of *E. faecalis* in Root Canals ex-vivo**. Int Endod J 2005; n. 38: p. 735-42.

63. SEDGLEY C.M., LEE E.H., MARTIN J.M., FLANNAGAN E.S. **Antibiotic Resistance Gene Transfer Between *Streptococcus gordini* and *Enterococcus faecalis* in Root Canals of Teeth *ex vivo***. J Endod 2008; n. 34: p. 570-4.
64. SEDGLEY C.M., LENNAN S.I., CLEWELL D.B. **Prevalence, Phenotype and Genotype of oral Enterococci**. Oral Microbiol Immunol 2004; n. 19: v. 95-101.
65. SCHIRRMEISTER J.F., LIEBENOW A-L., BRAUN G., WITTMER A., HELLWIG E., AL-AHMAD A. **Detection and Eradication of Microorganisms in Root-Filled Teeth Associated With Periradicular Lesions: An In Vivo Study**. J Endod 2007; v. 33, n. 5: p. 536- 40.
66. SHABAHANG S., ASLANYAN J., TORABINEJAD M. **The Substitution of Chlorhexidine for Doxycycline in MTAD: The Antibacterial Efficacy Against a Strain of *Enterococcus faecalis***. J Endod 2008; v. 34, n. 3: p. 288-90.
67. SHÄFER E., BÖSSMANN K. **Antimicrobial Efficacy of Chlorexidine and Two Calcium Hydroxide Formulations Against *Enterococcus faecalis***. J Endod 2005; v. 31, n. 1: p. 53-6.
68. SIGNORETTO C., LIEO M. M., TAFI M. C., CANEPARI P. **Cell Wall Chemical Composition of *Enterococcus faecalis* in Viable But Non Cultivable State**. Appl Environ Microbiol 2000; n. 66: p. 1953-59.
69. SIQUEIRA Jr J.F. **Endodontic Infeccions: Concepts Paradigms and Perspectives**. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 2002: n. 94; p. 281-93.
70. SIQUEIRA Jr J.F., ROÇAS I.N. **Exploiting Molecular Methods to Explore Endodontic Infeccions: Part I – Current Molecular Techonologies for Microbiological Diagnosis**. J Endod 2005; n. 31: p. 411-23.

71. SOARES J.A., CARVALHO M.A.R., SANTOS S.M.C., MENDONÇA R.M.C., RIBEIRO-SOBRINHO A.P., BRITO-JUNIOR M., MAGALHÃES P.P., SANTOS M.H., FARIAS L.M. **Effectiveness of Chemomechanical Preparation With Alternating Use of Sodium Hypochlorite and EDTA in Eliminating Intracanal *Enterococcus faecalis* Biofilm.** J Endon 2010; v. 36, n. 5: p. 894-98
72. SORENSEN S.J., BAILEY M, HANSEN L.H., KROER N, WUERTZ S. **Studying Plasmid Horizontal Transfer in situ: A Critical Review.** Nac Rev Microbiol 2005; n. 3: v. 700-10.
73. STUART C.H., SCHWARTZ S.A., BENSON T.J., OWALTZ C.B., ***Enterococcus faecalis*: Its Role in Root Canal Treatment Failure and Current Concepts in Retreatment.** J Endod 2006; v. 32: n. 2, p. 93-8.
74. SUNDE PT. **Microbiota of Periapical Lesions Refractory to Endodontic Therapy.** J Endod 2002; n. 28: p. 304-10.
75. SUNDQVIST G., FIGDOR D., PERSSON S., SJOGREN U. **Microbiology Analysis of Teeth With Failed Endodontic Treatment and Outcome of Conservative Re-treatment.** Oral Surg Oral Med Oral Patol. Oral Radiol Endodon 1998; n. 85; p. 86-93.
76. SVENSÄTER G., BERGENHOLTZ G. **Biofilm in Endodontic Infections.** Endodontic topics 2004; n. 9: p. 27-36.
77. TERVIT C., PAQUETE L., TORNECK C.D., BASRANI B., FREIDMAN S. **Porportion of Healed Teeth Apical Periodontitis Medicated With Two Percent Chlorhexidine Gluconate Liquid: A Case-Series Study.** J Endod 2010; v. 35, n. 9: p 1182-85.
78. TORABINEJAD M., SHABAHANG S., APRECIO R.M., KETTERING J.D. **The Antimicrobial Effect of MTAD: An In Vitro Investigation.** J Endod 2003; v. 29, n. 6: p 400-3.

79. TORABINEJAD M., CHO Y., KHADEMI A.A., BAKLAND L.K., SHABAHANG S. **The Effect of Various Concentrations of Sodium Hypochlorite and the Ability of MTAD to Remove the Smear Layer.** J Endod 2003; v. 29, n. 4: p 233-39.
80. TRONSTAD L., SUNDE P.T. **The Evolving New Understanding of Endodontic Infections.** Endodontic Topics 2003; n. 6: p. 57-77.
81. VALERA M.C., CHUNG A., MENEZES M.M., FERNANDES C.E.F., CARVALHO C.A.T., CAMARGO S.E.A., CAMARGO C.H.R. **Scanning Electron Microscope Evaluation of Chlorhexidine Gel and Liquid Associated With Sodium Hypochlorite Cleaning on the Root Canal Walls.** Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2010; n. 110: p. e82-7.
82. VIANNA E.M., GOMES B.P.F.A., BERBER V.B., ZAIA A.A., FERRAZ C.C.R., SOUZA-FILHO F.J. **In Vitro Evaluation of the Antimicrobial Activity of Chlorhexidine and Sodium Hypochlorite.** Oral Surg Oral Med Oral Pathol Radiol Endod 2004; n. 97: p. 79-94.
83. WANG P.I., SHIRASU S., DAITO M., OHURA K. ***Streptococcus mutans* Lipoteicoic Acid Induced Apoptosis in Cultured Dental Pulp Cells From Human Deciduous Teeth.** Biochem Biophys Res Commun 2001; n. 281: p. 957-61
84. WARNER G., FORMANEK H., GALLI D., WIRTH R. **Localization of Aggregation Substances of *Enterococcus faecalis* after Induction by Sex Pheromones - an Ultrastructural Comparison Using Immunolabeling, Transmission and High Resolution Scanning Electron Microscopic Techniques.** Arch Microbiol 1989; n. 151: p. 191-97.
85. ZAMBON J.J., HARASZTHY V.I. **The Laboratory Diagnosis of Periodontal Infections.** Periodontology 2000 1995; n. 7: p. 69-82.

86. ZOLETTI G.O., SIQUEIRA Jr J.F., SANTOS B.S. **Identification of *Enterococcus faecalis* in Root-filled Teeth With or Without Periradicular Lesions by Culture-Dependent and – Independent Approches.** J Endod; v. 32, n. 8: p. 722-26.