

João Vitor Rodrigues Brandão

**AVALIAÇÃO DA TERAPIA FOTODINÂMICA (TFD) COMO CO-
ADJUVANTE DO HIPOCLORITO DE SÓDIO NA DESINFECÇÃO INTRA-
CANALAR DE ENTEROCOCCUS FAECALIS (EF).**



Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2010

João Vitor Rodrigues Brandão

**AVALIAÇÃO DA TERAPIA FOTODINÂMICA (TFD) COMO CO-
ADJUVANTE DO HIPOCLORITO DE SÓDIO NA DESINFECÇÃO INTRA-
CANALAR DE ENTEROCOCCUS FAECALIS (EF).**

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2010

João Vitor Rodrigues Brandão

**AVALIAÇÃO DA TERAPIA FOTODINÂMICA (TFD) COMO CO-
ADJUVANTE DO HIPOCLORITO DE SÓDIO NA DESINFECÇÃO INTRA-
CANALAR DE ENTEROCOCCUS FAECALIS (EF).**

“ Projecto de Investigação apresentado à Universidade
Fernando Pessoa como parte dos requisitos para obtenção do grau
de Mestrado Integrado em Medicina Dentária”

Resumo

Introdução:

A presença de *Enterococcus Faecalis* (EF) no sistema tridimensional de canais radiculares está actualmente associada ao insucesso de tratamento convencional com recurso à desinfecção por Hipoclorito de Sódio (NaOCl). Os seus mecanismos de virulência e adaptação permitem à bactéria sobreviver a ambientes considerados desfavoráveis para a maioria dos agentes patogénicos orais, contudo a correlação entre a redução bacteriana do sistema de canais radiculares e o aumento da taxa de sucesso do tratamento pós obturação é um conceito universalmente aceite. Neste contexto a terapia fotodinâmica (TFD) surge como um método adjuvante na promoção de uma maior redução na contaminação bacteriana do sistema tridimensional de canais radiculares. O princípio de acção geral desta técnica envolve um fotossensibilizador (FS) activado por uma fonte de luz. Este fotossensibilizador, quando activado transforma o oxigénio molecular existente em espécies de oxigénio reactivo, altamente destrutivos para os microrganismos alvos. **Objectivo:** Verificar a eficácia da conjugação da TFD com o NaOCl, na inactivação de EF. **Materiais e Métodos:** Através de motores de busca de sites de publicações: Pubmed e Google Académico, foram pesquisados artigos disponíveis em Português, Inglês, Francês e Espanhol publicados nos últimos 10 anos, com recurso às seguintes palavras-chave: *Enterococcus Faecalis endodontics virulence* (15 artigos), *Photodynamic Therapy e Sodium Hypochlorite Endodontics AND Enterococcus Faecalis* (16 e 40 artigos obtidos respectivamente). Dos resultados obtidos foram seleccionados 23 artigos com base na relevância para o tema em estudo e disponibilidade dos mesmos. **Conclusão:** Apesar da investigação adicional à TFD ser necessária de modo a tornar os seus protocolos mais fiáveis, previsíveis e uniformes, parece ser promissora a utilização desta técnica quando conjugada aos actuais protocolos de instrumentação mecanizada e irrigação com NaOCl. A aparente complementaridade destas duas técnicas leva a uma redução adicional da carga de EF no sistema tridimensional de canais radiculares.

Abstract

Introduction: *Enterococcus Faecalis* (*EF*) associated with the failure of endodontically treated teeth using conventional techniques such as Sodium Hypochlorite (NaOCl) irrigation. Its virulence factors allow these bacteria to survive under adverse conditions. It's largely agreed that the nonexistence of bacteria on root canals increases the success rate after root canal treatment. Photodynamic therapy is thought to be responsible to achieve even higher reduction of bacterial load. This technique works by a light with a specific wavelength that physically interacts with a photo-activated drug which produces chemical molecules that directly binds and destroys bacteria. **Objective:** To verify the efficiency of the conjugation of photodynamic therapy and NaOCl to inactivate *EF*. **Materials and Methods:** A search was performed on Pubmed and Academic Google search engine sites. The following key words were used: *enterococcus faecalis endodontics virulence, Photodynamic Therapy e Sodium Hypochlorite Endodontics AND Enterococcus Faecalis*. Articles written in Portuguese, English, Spanish and French were selected. These articles range between the year 1985 and the current year. There were selected 23 articles **Conclusion:** Although TFD still needs further investigation to allow more predictable and reliable results it seems that this technique might have a role in reducing *EF* load in root canals if used together with NaOCl irrigation techniques.

Índice

Introdução	1
Materiais e Métodos	2
Desenvolvimento	2
1. O envolvimento da <i>Enterococcus faecalis</i> no insucesso do TENC	2
1.1 Os factores de virulência da <i>Enterococcus Faecalis</i> e o seu papel no insucesso do tratamento endodôntico;.....	3
2. Características de desinfecção do tratamento endodôntico convencional.	4
3. A terapia fotodinâmica	6
3.1 Mecanismos de acção da terapia fotodinâmica	6
3.2 Tipos de luz e agentes fotossensibilizadores	6
4. A terapia fotodinâmica como co-adjuvante do tratamento endodôntico convencional.	8
Conclusão	15
Bibliografia	16

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

TFD- Terapia fotodinâmica

EF- Enterococcus Faecalis

NaOCl- Hipoclorito de Sódio

NaCl- Cloreto de Sódio

FS- Fotossensibilizador

PCR- Polymerase chain reaction

TENC- Tratamento endodôntico não cirúrgico

EDTA- Ácido etilendiaminotetracético

AM- Azul de Metileno

AT- Azul de Toluidina

ADN- Ácido desoxirribonucleico

PFDHN- Perfluorodecahidrocarboneto

H₂O₂- Peróxido de Hidrogênio

CFU- Unidades formadoras de colônias

MIX- Glicerol, Água e Etanol

λ - Comprimento de onda

P- Potência

\emptyset - Diâmetro de fibra

E- Energia de fluência

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Revisão de estudos da utilização de TENC e TFD para eliminar biofilme bacteriano de *EF* com 7 dias e 10 semanas. Estudo sobre a produção de oxigênio singuleto através de diferentes formulações de FS. (Souza *et al.*, 2010, George *et al.*, 2008, página 12 e 13)

Tabela 2. Revisão de estudo *ex vivo* para eliminação de biofilme bacteriano de *EF* em biofilme bacteriano maduro e imaturo usado a TFD, o tratamento convencional com NaOCl ou a conjugação de ambos. (Lim *et al.*, 2009, Página 14)

Introdução

Recentes avanços tecnológicos como a análise de marcadores genéticos (*Polymerase chain reaction*, PCR) e a sua aplicação na área da endodontia, permitiram verificar que através do uso de técnicas endodônticas convencionais a desinfecção completa do sistema de canais radiculares é de difícil obtenção (Garcez *et al.*, 2006).

A correcta desinfecção durante um TENC (tratamento endodôntico não cirúrgico) está reconhecida como factor crucial na taxa de sucesso a longo prazo no tratamento endodôntico convencional. Por sua vez, esta depende de vários factores, como a anatomia complexa e diversa do sistema de canais radiculares e a resistência antimicrobiana (Garcez *et al.*, 2006).

O procedimento clínico convencional no TENC, actualmente aceite para eliminar a infecção intra-canal, inclui o desbridamento do canal radicular, a sua instrumentação, a irrigação com Hipoclorito de Sódio (NaOCl) e EDTA, a aplicação de um material contendo um agente antimicrobiano (como o Hidróxido de Cálcio entre sessões) e o selamento do canal radicular (Garcez *et al.*, 2007).

No estudo intitulado de “Terapia Fotodinâmica para Desinfecção endodôntica” é conclusivo que “apesar do foco bacteriano infeccioso ser removido durante a instrumentação endodôntica e irrigação com NaOCl, no momento da obturação metade dos dentes em estudo apresentam bactérias resistentes” (Soukos *et al.*, 2006).

Após o TENC, estas bactérias resistentes possuem um carácter proliferativo no sistema de canais radiculares (Fonseca *et al.*, 2008). As bactérias associadas a este insucesso são bactérias gram-positivas, predominando as espécies anaeróbias e facultativas. Esta predominância não se aplica às bactérias encontradas no sistema de canais radiculares infectados antes do tratamento (Soukos *et al.*, 2006). De todas as bactérias associadas ao insucesso do TENC a *Enterococcus Faecalis* (EF) surge como uma das bactérias presentes mais comuns (Fonseca *et al.*, 2008).

A ideia de auxiliar a desinfecção do canal radicular é de grande interesse e deve ser estudada para um aperfeiçoamento do TENC. Neste contexto, a terapia fotodinâmica (TFD) surge como uma possibilidade no aumento adicional da eficácia do tratamento

convencional com desinfecção mediada por NaOCl (Souza *et al.*, 2010 e Garcez *et al.*, 2006).

Em Endodontia a TFD associa luz de um determinado comprimento de onda emitida por um laser que activa um agente FS (fotossensibilizador). Esse agente, por sua vez, interage com o substrato, composto por oxigénio molecular e água sensibilizando as bactérias alvo. A sensibilização é citotóxica e ocorre de duas maneiras distintas: através de um sistema de oxidação-redução, gerando radicais livres e morte celular bacteriana ou através da libertação de energia que transforma o oxigénio molecular em oxigénio singuleto sendo citotóxico e letal para microrganismos (Fonseca *et al.*, 2008).

Este artigo procura compreender com recurso a uma consulta bibliográfica em que medida a TFD combinada com o tratamento convencional será eficaz para a inactivação de *EF* e de que modo poderá esta combinação de técnicas ser utilizada para melhorar os protocolos actualmente usados.

Materiais e Métodos

Para a realização deste artigo foi pesquisado através de motores de busca de sites de publicações: Pubmed e Google Académico, artigos disponíveis em Português, Inglês, Francês e Espanhol publicados nos últimos 10 anos, com recurso às seguintes palavras-chave: *Enterococcus Faecalis endodontics virulence* (15 artigos), *Photodynamic Therapy e Sodium Hypochlorite Endodontics AND Enterococcus Faecalis* (16 e 40 artigos obtidos respectivamente). Dos resultados obtidos foram seleccionados 23 artigos com base na relevância para o tema em estudo e disponibilidade dos mesmos.

Desenvolvimento

1. O envolvimento da *Enterococcus faecalis* no insucesso do TENC

Recorrendo a recentes métodos de avaliação ópticos e microbiológicos aplicados no ramo da endodontia, foi possível identificar a *EF* como uma das principais bactérias envolvidas na infecção endodôntica primária e secundária. Esta bactéria tem sido bastante estudada, de modo a compreender as suas características específicas no sistema de canais radiculares e desenvolver protocolos de desinfecção mais eficazes do que os actualmente estabelecidos. Procurando estudar a presença de *EF* no insucesso do TENC

e recorrendo à análise de marcadores genéticos, Stuart *et al.*, (2006) detectaram dados consistentes na presença de *EF* em infecções endodônticas secundárias, variando de 67% a 77% dos casos (Stuart *et al.*, 2006).

O capítulo seguinte visa expor os mecanismos de virulência conhecidos da *EF*, conferindo à sua correcta eliminação, um papel fulcral no sucesso do TENC.

1.1 Os factores de virulência da *Enterococcus Faecalis* e o seu papel no insucesso do tratamento endodôntico;

Apesar desta espécie bacteriana existir na microflora normal da cavidade oral, o papel interveniente associado à *EF* no insucesso do TENC deve-se às excelentes capacidades de adaptação a condições apontadas como desfavoráveis à maioria das estirpes bacterianas. Relativamente à presença de *EF* em canais radiculares tratados, Kaufman *et al.*, (2005), inferiram no seu artigo que relacionava a presença de *EF* em canais radiculares tratados, a possibilidade de colonização de *EF* ocorrer durante a terapia endodôntica inicial ou a posterior micro infiltração.

A resistência desta bactéria Gram-positiva anaeróbia facultativa deve-se possivelmente às características enumeradas por Stuart *et al.*, (2006), no artigo “O papel de *EF* no insucesso do TENC e actuais conceitos de tratamento”. As características mencionadas sobre a *EF* são: a capacidade em produzir proteínas, permitindo unir-se à dentina; a sua penetração nos túbulos dentinários, mantendo-se viável no seu interior, e impossibilitando a acção de agentes antimicrobianos como o NaOCl; a sobrevivência a longos períodos de privação nutricional; a sua união ao colagénio tipo I, aquando da utilização nutricional de soro originário do osso alveolar ou do ligamento periodontal; a presença desta bactéria em biofilme torna-a 1000 vezes mais resistente à resposta imunitária do hospedeiro e à acção de antibióticos, relativamente a bactérias que não se estabelecem em biofilme; um sistema de manutenção da homeostasia, permitindo sobreviver a um PH na ordem dos 11.5 (valor referido como dificilmente alcançado por irrigantes no canal radicular), resistindo ao PH induzido pelo NaOCl e outros agentes de irrigação (Stuart *et al.*, 2006).

Com base nas características específicas de resistência de *EF* é possível compreender como o actual protocolo de irrigação com NaOCl, bem como de outros agentes

antimicrobianos, não alcançam de um modo previsível a erradicação desejável desta bactéria. No capítulo seguinte abordaremos as características da técnica de irrigação actualmente utilizadas em Endodontia.

2. Características de desinfecção do tratamento endodôntico convencional.

Os protocolos actualmente estabelecidos em Endodontia enfatizam o uso de mecanismos químico-mecânicos para desinfectar convenientemente o sistema de canais radiculares de bactérias envolvidas no insucesso do tratamento endodôntico.

A preparação mecânica permite a remoção de dentina e tecido pulpar do canal radicular. Esta remoção devido ao aumento de calibre do canal radicular permite o alcance de agentes irrigantes (como o NaOCl) às bactérias presentes no complexo sistema de canais radiculares e túbulos dentinários. A instrumentação dota o canal radicular de uma conformação compatível a uma obturação eficiente, o que diminui o risco de posterior infiltração bacteriana do espaço endodôntico. (Stuart *et al.*, 2006).

A irrigação química do sistema de canais radiculares aumenta a redução da população bacteriana de *EF*. Stuart *et al.*, (2006), no seu artigo mencionado no capítulo anterior, revela que o NaOCl a 3% usado em quantidades adequadas possui a capacidade de destruir *EF* do canal radicular mesmo quando associado em biofilme (Stuart *et al.*, 2006).

As principais vantagens mencionadas advindas da utilização do NaOCl como irrigante em Endodontia são: a capacidade de dissolução de tecidos vitais e não vitais; um largo espectro anti-bacteriano contra esporos, fungos e vírus; boas características lubrificantes auxiliando a instrumentação mecânica do canal radicular; uma baixa tensão superficial, aumentando a penetração no canal radicular (Siqueira *et al.*, 2000). Aliadas a estas vantagens ainda podemos referir que o NaOCl é de fácil obtenção e apresenta baixo custo (Hulsmann *et al.*, 2003).

Apesar das vantagens mencionadas anteriormente, o NaOCl possui limitações como a potencial acção tóxica para os tecidos periapicais, penetração limitada nos túbulos dentinários, sabor desagradável, perda da eficácia ao longo do tempo, actuação apenas por contacto e risco de acidentes na sua manipulação. (Gambarini *et al.*, 1999).

A concentração de NaOCl utilizada em contexto clínico varia dos 0.5% a 6%, uma vez que concentrações acima deste valor aumentam o seu efeito tóxico, não acrescentando de acção antibacteriana adicional. (Clarkson *et al.*, 2003).

Mencionando os factores que fazem variar a eficácia do NaOCl devemos ter em conta a temperatura, concentração, volume, fluxo, profundidade da agulha, tempo de armazenamento e o tempo de actuação no canal radicular. (Siqueira *et al.*, 2000).

Análises realizadas através de microscopia electrónica demonstraram que a penetrabilidade do NaOCl no interior dos túbulos dentinários apenas alcança os 130µm (Foschi *et al.*, 2007). A conhecida capacidade do *EF* em infectar extensões de túbulos dentinários que alcançam os 1000µm, fez com que se introduzisse no protocolo de irrigação actualmente estabelecido, agentes quelantes como o EDTA.

Actualmente, pensa-se que a concentração mais eficaz de EDTA varia entre 15% e 17%, devendo ser utilizado em alternância com irrigantes como o NaOCl a baixas concentrações, ou como irrigante final nas situações em que o NaOCl é utilizado em concentrações mais elevadas (Soares *et al.*, 2007).

Esta combinação NaOCl com EDTA, é bastante eficaz na remoção de tecido orgânico e inorgânico do sistema de canais radiculares, abrindo os túbulos dentinários e melhorando assim a capacidade antibacteriana e a obturação tridimensional (Garcia *et al.*, 2001). Apesar de não possuir actividade antimicrobiana, o EDTA é eficiente na remoção da porção inorgânica da smear layer, permitindo a outros irrigantes um melhor acesso aos túbulos dentinários (Stuart *et al.* 2006).

Contudo, recorrendo novamente à microscopia electrónica, no artigo denominado: “TFD para desinfeção endodôntica”, Soukos *et al.*, (2006), referem que apesar da simbiose de características entre o EDTA e o NaOCl, observa-se infecção bacteriana intratubular densa a partir dos 250µm (Soukos *et al.*, 2006). Esta análise indica a impossibilidade da completa desinfeção de microrganismos em profundidade nalguns casos, o que remete ao insucesso do TENC.

A remoção mais eficaz de microrganismos com carácter proliferativo, como a *EF*, motivou a investigação de novos métodos que possam auxiliar a atingir este objectivo. No capítulo seguinte abordaremos uma técnica que nos trabalhos de investigação mais

recentes tem sido apontada como sendo capaz de auxiliar as técnicas actuais de desinfecção do sistema de canais radiculares.

3. A terapia fotodinâmica

3.1 Mecanismos de acção da terapia fotodinâmica

A TFD ou desinfecção foto activada é uma técnica cujas propriedades têm demonstrado potencial na desinfecção do sistema de canais radiculares. Esta técnica baseia-se num princípio que implica uma luz de determinado comprimento de onda, um corante foto activo não tóxico (fotossensibilizador) e oxigénio (Souza et al., 2010). O agente fotossensibilizador é colocado em contacto com as células alvo e absorvendo a luz, desencadeia dois mecanismos de acção que originam a lise celular. O mecanismo tipo I é mediado pela libertação de radicais livre, altamente reactivo e o mecanismo tipo II sintetiza oxigénio reactivo singuleto a partir do oxigénio molecular existente (Bouillaget *et al.*, 2008). Estas espécies de oxigénio reactivas foram apontadas como eficazes para a destruição de bactérias tanto Gram positivas como também Gram negativas (Lim *et al.*, 2009).

Esta técnica leva a uma baixa toxicidade para o hospedeiro. Neste âmbito, Garcez *et al.*, (2008) no artigo intitulado: “Efeitos antimicrobianos da TFD em pacientes com doença periapical e polpa necrótica”, referem que os mecanismos de acção da TFD apresentam selectividade na destruição de microrganismos bacterianos quando comparando a mesma acção sobre as células do hospedeiro (Garcez *et al.*, 2008). Esta selectividade deve-se a sistemas de resistência à reacção oxidativa mais desenvolvidos existentes nas células do hospedeiro quando comparados aos microrganismos a eliminar (Bouillaget *et al.*, 2008).

3.2 Tipos de luz e agentes fotossensibilizadores

Duas fontes de luz diferentes têm sido testadas na TFD. A luz de espectro vermelho funciona com comprimento de onda com cerca de 630nm, já a luz de espectro azul funciona com comprimento de onda na ordem dos 380nm a 500nm.

A luz de espectro azul possui um comprimento de onda mais curto, como consequência promove uma maior formação de espécies de oxigénio reactivo. Contudo existem poucos FS estudados que se activem nestes espectros de luz (Bouillaget *et al.*, 2008).

A luz de espectro vermelho produzida por lasers de baixa potência, conjugada com FS como o Azul de Metileno (AM) ou Azul de Toluidina (AT), têm sido apontada como uma técnica promissora para aumentar a desinfeção do tratamento endodôntico. (Garcez *et al.*, 2008) Contudo, algumas limitações são apontadas à TFD como o trauma térmico dos tecidos envolventes e o risco de pigmentação permanente dos dentes (Bouillaget *et al.*, 2008 e Foschi *et al.*, 2007). Em relação ao risco de trauma térmico, Dickers *et al.*, (2009) no artigo: “Aumento da temperatura de canais radiculares durante a desinfeção foto activada”, reportam que os lasers de baixa potência associados à TFD não sobreaquecem os tecidos periapicais mesmo quando submetidos a longos períodos de irradiação (Dickers *et al.*, 2009). No que diz respeito à pigmentação provocada pelos FS utilizados pela TFD, Fonseca *et al.*, (2008) no artigo sobre a TFD em canais radiculares contaminados por *Enterococcus Faecalis*, referem a utilização de menores concentrações dos FS, reduzindo assim o risco de pigmentação dentária (Fonseca *et al.*, 2008).

Vários autores referem na literatura sobre a TFD, o uso de uma fibra óptica introduzida no canal radicular para distribuir a luz homogeneamente sobre toda a superfície. Esta fibra garante uma melhor foto reacção ao irradiar a luz na totalidade dos 360° do canal, desde a sua porção coronal até ao terço apical (Garcez *et al.*, 2008; Fimple *et al.*, 2008; Souza *et al.*, 2010; Soukos *et al.*, 2006 e Foschi *et al.*, 2007).

O AM e o AT são os FS mais estudados para promoção da desinfeção canalar contra espécies bacterianas gram positivas e gram negativas, na TFD (Souza *et al.*, 2010).

O AM é um corante orgânico, pertencente à família das fenotiazinas cujas propriedades hidrófilas, baixo peso molecular e carga positiva permitem exercer um potencial foto tóxico na membrana celular bacteriana e no seu ADN (Soukos *et al.*, 2006). Este corante funciona num espectro de luz que se activa por volta dos 656nm e Fimple *et al.*, (2008) referem que possui capacidade de se infiltrar nos túbulos dentinários (Fimple *et al.*, 2008).

Já o AT é um agente FS usado na terapia fotodinâmica com laser de espectro de luz vermelha absorvendo a luz com comprimento de onda que varia entre os 620 e 660nm desencadeando a libertação de espécies reactivas de oxigénio (Soukos *et al.*, 2006).

4. A terapia fotodinâmica como co-adjuvante do tratamento endodôntico convencional.

Citando Garcez *et al.*, (2008), “A TFD é um tratamento com potencial para ser usado concomitantemente ao tratamento endodôntico convencional promovendo uma redução adicional da população bacteriana”. Souza *et al.*, (2010) afirmam que “o maior potencial da tecnologia da TFD para promover uma redução bacteriana acontece quando associado ao TENC” (Souza *et al.*, 2010). Lim *et al.*, (2009) também sugerem a mesma ideia ao referir vários estudos que indicam o uso da TFD como um meio adjuvante na eliminação de focos residuais bacterianos do sistema de canais radiculares após preparação químico-mecânica (Lim *et al.*, 2009).

Com o objectivo de avaliar a eficácia de destruição de EF, através da combinação da TFD com NaOCl, foram seleccionados 3 artigos que reuniam grupos experimentais com estas características pretendidas. Os artigos que abordaram de uma forma comparativa a temática deste trabalho são os seguintes: Souza *et al.*, (2010), George *et al.*, (2008) e Lim *et al.*, (2009). Os resultados obtidos em cada um dos artigos mencionados por apresentarem diferenças nos protocolos de actuação não devem ser extrapolados entre si, porém estudam parâmetros relevantes para a desinfecção em Endodontia como os protocolos de luz utilizados na TFD, diferentes composições de FS utilizados, a eficácia do tratamento convencional associado à TFD na redução de EF quando associado em biofilme com diferentes tempos de maturação, tal como a capacidade de desinfecção de EF em profundidade dos túbulos dentinários. No final do capítulo constam duas tabelas (tabela 1 e tabela 2) que permitem apresentar todas as características dos artigos mencionados de forma pormenorizada.

De modo de a testar a TFD utilizando dois FS diferentes como suplemento aos procedimentos de irrigação/instrumentação para promover redução de *Enterococcus Faecalis* em canais radiculares, Souza *et al.*, 2010, procurou estudar os efeitos antibacterianos adicionais da TFD com AM ou AT, após tratamento endodôntico convencional de canais radiculares contaminados por *Enterococcus Faecalis*. Quatro

grupos experimentais numerados de 1 a 4 foram criados, nestes grupos testaram os irrigantes NaOCl a 2.5% e o NaCl a 0.85% em associação à TFD usando AM ou AT.

Os resultados desta experiência mostraram não existir diferença estatística significativa entre a conjugação da TFD e o tratamento convencional, apesar de se ter verificado uma redução suplementar na população bacteriana. No entanto a associação entre o tratamento convencional e a TFD aumentou o número de ocorrências de culturas negativas obtidas a partir dos canais radiculares. Os autores deste estudo concluíram que para a TFD ser usada na prática clínica, como complemento do protocolo convencional, certos critérios devem ser aprofundadamente estudados, para aumentar a sua eficácia. Esta eficiência pode aumentar caso se melhore a difusão do FS nas irregularidades do canal, acrescentando a oxigenação do ambiente intra-canal ou caso se melhorem os parâmetros de luz utilizados (Souza *et al.*, 2010).

No estudo concebido por George *et al.*, 2008 designado: "Aumento da eficácia antibiofilme da TFD com inclusão de transportador de oxigénio e agente oxidante", os autores procuraram estudar a hipótese de incluir um oxidante e um transportador de oxigénio na fórmula do FS. Esta inclusão pode aumentar a foto-oxidação da TFD e facilitar a ruptura da matriz de biofilme bacteriano. O objectivo deste estudo foi estudar certos critérios da TFD usando diferentes FS: a capacidade de gerar oxigénio singuleto, a sua eficácia para erradicar biofilme bacteriano de *EF* com 7 dias num modelo *in vitro* e com 10 semanas no modelo *ex vivo*.

Nesta primeira etapa, quanto à formação de oxigénio singuleto, os resultados foram descritos por ordem decrescente do seguinte modo: PF4> PF1> PF3> PF2 correspondendo respectivamente a valores absolutos de $1.95\mu\text{mol}\backslash\text{L}\backslash\text{min}$ > $1.8\mu\text{mol}\backslash\text{L}\backslash\text{min}$ > $1.39\mu\text{mol}\backslash\text{L}\backslash\text{min}$ > $0.55\mu\text{mol}\backslash\text{L}\backslash\text{min}$. O FS usado em PF4 apresenta associado ao AM o transportador de oxigénio PFDHN(perfluordecáhidronaftaleno) e o agente oxidante Peróxido de Hidrogénio. (AM a $50\mu\text{mol}\backslash\text{mL}$ PFDHN, H₂O₂ e triton X-100 a uma razão de 75:24.5:0.5)

A segunda etapa do estudo procurou avaliar através da microscopia electrónica, a redução de espessura de biofilme antibacteriano de *EF* recorrendo a diferentes formulações de FS. Comparando os valores obtidos através da TFD com AM a 100

$\mu\text{mol/mL}$ e o grupo PF4, a partir de uma espessura de biofilme de $17\mu\text{m}$ inicial obtiveram-se valores de $12\mu\text{m}$ e $6\mu\text{m}$ respectivamente.

A terceira etapa deste estudo corresponde à análise da eficácia de diferentes métodos de erradicação de *EF* em biofilme de 10 semanas num total de 30 peças dentárias. Cinco grupos experimentais foram criados: Grupo 1- grupo controlo; Grupo 2- tratamento convencional químico mecânico desinfecção mediada por 5 ml de NaOCl (5.25%) e irrigação final com EDTA a 17%; Grupo 3- Instrumentação e recurso à TFD com AM a $100\mu\text{mol/L}$; Grupo 4- os canais radiculares foram submetidos a instrumentação mecânica e após sujeitos a TFD sendo o FS PF4 ; Grupo 5 (tratamento convencional conjugado com TFD com PF4) - os canais radiculares foram submetidos a tratamento convencional (grupo 2) e após este sujeitos à TFD descrita (grupo 4).

Os resultados revelam que após 4 horas de incubação, a tratamento endodôntico convencional (grupo 2) reduziu a população bacteriana em 96.89%. Nos restantes 3 grupos, nenhuma unidade formadora de colónias foi detectada. Uma nova avaliação após 24 horas indicou que no grupo 1 e 2, 100% dos dentes possuíam bactérias activas, no grupo da preparação químico mecânica convencional (grupo 3) 60% dos dentes já apresentavam formação de bactérias, enquanto nos restantes, grupos 4 e 5, nenhum apresentava bactérias activas.

Os autores deste estudo concluíram que o uso de FS contendo transportadores de oxigénio, como foi o caso do PF4, são capazes de promover a ruptura do biofilme bacteriano e inactivar bactérias, como se verificou pela redução da espessura e descontinuidade da estrutura do biofilme. A acção complementar desempenhada pelo transportador de oxigénio assegura uma concentração adequada de oxigénio que degrada a matriz do biofilme bacteriano, bem como auxilia também na penetração do FS. O aumento da formação de oxigénio singuleto pensa-se ser responsável pela completa inactivação e ruptura do biofilme bacteriano maduro (George *et al.*, 2008).

Lim *et al.*, (2010) com objectivo de avaliar a eficácia de diferentes técnicas de desinfecção endodôntica com recurso à TFD e ao tratamento convencional, na destruição de biofilme bacteriano de *EF* imaturo (4 dias) e maduro (com 4 semanas), conceptualizou um estudo em duas etapas.

Na primeira etapa para estudar a acção sobre biofilme de *EF* imaturo, cinco grupos experimentais foram criados: Grupo 1- Grupo de controlo; Grupo 2- Apenas luz foi incidida nos canais radiculares; Grupo 3- TFD convencional com AM 100µmol durante 20 minutos; Grupo 4- Irrigação com NaOCl a 5.25% durante 20 minutos; Grupo 5- TFD (melhorada) cujo FS foi AM 100µmol suspenso numa solução de glicerol, água, e etanol (MIX) juntamente com PFDHN irradiado por 20 minutos. Nas amostras de cada grupo, com o intuito de analisar a eficiência de cada metodologia aplicada sobre a inactivação bacteriana após proliferação intra-tubular foram removidas de cada dente, duas porções de dentina canal, com espessura de 1mm e 2mm.

Nesta etapa observou-se em todos os grupos experimentais redução da população bacteriana, comparando com o grupo de controlo. Contudo, esta redução foi mais marcada no grupo em que foi empregue NaOCl e a TFD melhorada. Não se verificou uma diferença estatisticamente significativa entre estes grupos relativamente à profundidade de 1 mm. No entanto, ao analisar a eficácia para 2 mm de profundidade, o grupo da TFD melhorada erradicou completamente a população bacteriana, ao contrário do grupo em que o NaOCl foi usado.

Na segunda etapa para estudar a acção sobre biofilme de *EF* maduro, cinco grupos experimentais foram criados: Grupo 1- Grupo de controlo; Grupo 2- TFD convencional com AM 100µmol durante 20 minutos; Grupo 3- TFD (melhorada) cujo fotossensibilizador foi AM 100µmol suspenso numa solução de glicerol, água, e etanol (30:50:20) e PFDHN irradiado por 20 minutos; Grupo 4 (Tratamento convencional) – instrumentação com irrigação mediada por NaOCl a 5.25% e EDTA 17%; Grupo 5 (TFD melhorada + tratamento convencional químico mecânico) - foi aplicado aos canais radiculares os procedimentos descritos no grupo 4 e grupo 3. Os resultados demonstram que a sobrevivência bacteriana foi, por ordem, a seguinte: Grupo de controlo > TFD convencional > TFD melhorada > Tratamento convencional > Tratamento convencional + TFD melhorada. O tratamento convencional, reduziu a população bacteriana em 99.96%, enquanto que associado à TFD melhorada, eliminou 99.99%.

Os autores deste estudo concluíram que a capacidade desinfectante destes agentes antimicrobianos depende, em grande parte, do estado de maturação do biofilme bacteriano. Ambos os grupos, NaOCl e TFD melhorada, foram eficazes na inactivação de biofilme endodôntico imaturo, contudo, a TFD melhorada é mais eficaz na destruição

bacteriana em profundidade dos túbulos dentinários quando equiparado com a TFD convencional ou NaOCl. Uma combinação da TFD melhorada e tratamento convencional é necessária para reduzir significativamente a população bacteriana, em biofilme maduro com 4 semanas (Lim *et al.*, 2010).

Referência	Objectivo	Laser FS Agente irrigante	Grupos em estudo	Resultados
Souza et al., 2010	Efeitos antibacterianos adicionais da TFD com AM ou AT	Laser diodo $\lambda=660\text{nm}$, P=40mW, \varnothing fibra = 300 μm Tempo- 4minutos	1- AM+NaOCl 2- AT + NaOCl 3- AM + NaCl 4- AT + NaCl	(eliminação bacteriana)
		F.S AM 15 $\mu\text{g/mL}$ AT 15 $\mu\text{g/mL}$		1- p = 0.67 2- p = 0.73 3- p = 0.09 4- p = 0.005
		Agente irrigante NaOCl 2.5% NaCl 0.85% EDTA 17%		
Conclusão: Não se encontram diferenças entre os dois agentes FS. São necessários ajustes no protocolo e o estabelecimento de protocolos na utilização de TFD para aumentar a predictabilidade na desinfecção endodôntica antes de ser recomendado ao uso clínico.				
George et al., 2008 (Etapa1) In vitro	Testar diferentes formulações de fotossensibilizadores para produzir oxigênio singuleto	Laser diodo λ - 664nm P- 30mW E- 31.24 J/cm ³ \varnothing fibra = 400 μm	PF1- AM+PFDHN PF2- PF1+ H ₂ O ₂ PF3- PF2+tritonX-100 (60:35:5) PF4- AM+PFDHN + H ₂ O ₂ + tritonX-100(75:24.5:0.5)	(Produção de oxigênio singuleto) PF1- 1.8 $\mu\text{mol/L}\text{/min}$ PF2- 0.55 $\mu\text{mol/L}\text{/min}$ PF3- 1.39 $\mu\text{mol/L}\text{/min}$ PF4- 1.95 $\mu\text{mol/L}\text{/min}$

<p>George et al., 2008 (Etapa 2) Biofilme 7 dias (In vitro)</p>	<p>Através de microscopia electrónica avaliar a redução de espessura do biofilme bacteriano de <i>EF</i> com 7 dias</p>	<p>Laser diodo λ - 664nm P- 30mW E- 31.24 J/cm³ Ø fibra= 400µm AM 100 µmol/mL AM + PFDHN + H₂O₂ + triton X-100 (75:24.5:0.5)</p>	<p>1- AM 100 µmol/mL + Luz 2- AM + PFDHN + H₂O₂ + tritonX-100 (75:24.5:0.5) + Luz 3- Luz</p>	<p>(Espessura de biofilme bacteriano)</p> <p>1- 12 µm 2- 6µm 3- 17µm</p>
<p>George et al., 2008 (Etapa 3) Biofilme 10 semanas Ex Vivo</p>	<p>Através da contagem de unidades formadoras de colónias contabilizaram-se os controlos positivos dos grupos em estudo após 24 horas</p>	<p>Laser diodo λ - 664nm P- 30mW E- 31.24 J/cm³ Øfibra= 400µm AM 100µm/ml AM+PFDHN+H₂O₂+ tritonX-100 (75:24.5:0.5)</p>	<p>1-Grupo controlo 2-instrumentação + NaOCl 5.25%+ EDTA 17% 3-Instrumentação + AM 100µm/ml + Luz 4-Instrumentação + AM+PFDHN+H₂O₂+ tritonX-100 (75:24.5:0.5) + Luz 5- instrumentação + grupo 2 + grupo 4</p>	<p>(controlo bacteriano positivo após 24h)</p> <p>1- 100% 2- 100% 3- 60% 4- 0% 5- 0%</p>
<p>Conclusão: O uso de fotossensibilizadores contendo transportadores de oxigénio são capazes de promover a ruptura e inactivação do biofilme bacteriano maduro. Estes transportadores aumentam a concentração de oxigénio e a penetrabilidade do FS. A TFD com FS contendo transportador de oxigénio por si só ou como adjuvante do tratamento convencional inactivaram todas as bactérias de <i>EF</i>.</p>				

Tabela 1. Revisão de estudos da utilização de TENC e TFD para eliminar biofilme bacteriano de *EF* com 7 dias e 10 semanas. Estudo sobre a produção de oxigénio singuleto através de diferentes formulações de FS. Souza et al., 2010, George et al., 2008. (Página 12 e 13)

Referência	Objectivo	Laser e FS Agente irrigante	Grupos em estudo	Resultados (sobrevivência log ₁₀)	
Lim et al., (2009) Experiência 1 Ex Vivo	Avaliar a sobrevivência bacteriana em biofilme com 4 dias obtidos em diferentes profundidades da parede do canal radicular após tratamento convencional e TFD	Laser: Diodo $\lambda - 660\text{nm}$ E- 36 J/cm^3 Øfibra= $400\mu\text{m}$ Tempo-20 m	1-Controlo 2-Luz 3- AM + Luz 4NaOCl 5.25% 5-AM + MIX +PFDHN	1mm	2mm
		FS: AM $100 \mu\text{mol}$ + MIX +PFDHN AM $100\mu\text{mol}$		1-6.98 2- 4.7 3-5.8	1-6.8 2-1.5
		Agente irrigante: NaOCl 5.25%		4-0.7 5- 0.8	3-4.3 4-0.97 5- 0
Lim et al., (2009) Experiência 2 Ex Vivo	Avaliar a sobrevivência bacteriana em biofilme com 4 semanas obtidos da parede do canal radicular após tratamento convencional e TFD	Laser: Diodo $\lambda - 660\text{nm}$ E- 36 J/cm^3 Øfibra= $400\mu\text{m}$ Tempo- 20 m	1-Controlo 2-AM + Luz 3- AM + MIX +PFDHN 4- instrumentação+ NaOCl + EDTA 5- grupo 3 + grupo 4	1- 8.9 2- 8.5 3- 7.4 4- 5.5 5- 1.9	
		FS: AM $100 \mu\text{mol}$ + MIX +PFDHN AM $100\mu\text{mol}$			
		Agente irrigante: NaOCl 5.25% EDTA 17%			
Conclusão: Ambos os grupos, NaOCl e TFD melhorada, foram eficazes na inactivação de biofilme endodóntico imaturo. A TFD melhorada é mais eficaz na destruição bacteriana em profundidade dos túbulos dentinários. Uma combinação da TFD melhorada e tratamento convencional é necessária para reduzir significativamente a população bacteriana associada em biofilme maduro com 4 semanas.					

Tabela 2. Revisão de estudo *ex vivo* para eliminação de biofilme bacteriano de *EF* em biofilme bacteriano maduro e imaturo usado a TFD, o tratamento convencional com NaOCl ou a conjugação de ambos.(Lim et al., 2009)

Conclusão

Tendo em conta a importância da redução bacteriana para o sucesso do TENC parece pertinente a procura de novos e mais eficazes métodos de desinfecção. A análise de estudos realizada ao longo deste trabalho aponta para o importante papel potencial da TFD para proporcionar efeitos adicionais à desinfecção com NaOCl. A capacidade de penetração do FS, bem como a capacidade de formação de oxigénio singuleto, podem ser factores importantes na eliminação de bactérias consideradas como persistentes em casos de re-infecção endodôntica.

É necessário realçar que será necessário aumentar a eficácia e previsibilidade dos resultados obtidos com a TFD. Para atingir este objectivo é necessário o desenvolvimento de FS mais eficazes face aos actualmente utilizados e definir os parâmetros da luz utilizada na desinfecção. A padronização do protocolo de utilização da TFD é uma medida importante para que a investigação nesta área possa atingir níveis de significância estatística uniformes. Os estudos consultados neste trabalho carecem de investigação em casos *in vivo*, seria relevante existir informação disponível com este tipo de estudo para compreender melhor como esta técnica poderá ser eficaz no quotidiano clínico.

Concluindo, a aparente complementaridade destes dois métodos de desinfecção (TFD e NaOCl) leva a uma redução adicional da carga de *EF* no sistema tridimensional de canais radiculares mesmo no caso de penetração bacteriana nos túbulos dentinários e estabelecimento em biofilme com avançado estado de maturação.

Bibliografia

Bouillaget S. *et al* (2008). Intracellular reactive oxygen species in monocytes generated by photosensitive chromophores activated with blue light. *Dental Materials*, Aug; 24(8): 1070-6.

Bystrom, A., Sundquist, G. (1985). The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. *Int Endod Journal* 1985;18:35–40

Clarkson, R. *et al.*, (2006). Dissolution of porcine incisor pulp in sodium hypochlorite solutions of varying compositions and concentrations. *In: Australian Dental Journal*, 3 (51).

Dickers B. *et al.*, (2009). Temperature rise during photo-activated disinfection of root canals. *Lasers Med Sci*, 24, pp. 81-85.

Fimple J.L. *et al* (2008). Photodynamic treatment of endodontic polymicrobial infection in vitro. *Journal of Endodontics*, 34, pp. 728–734.

Fonseca M.B. *et al* (2008). Photodynamic Therapy for Root Canals Infected with *Enterococcus Faecalis*. *Photomedicine and Laser Surgery*, Jun 26(3), pp.209-213.

Foschi F. *et al* (2007). Photodynamic inactivation of *Enterococcus faecalis* in dental root canals in vitro. *Lasers in Surgery and Medicine*, 39, pp.782–787.

Gambarini, G. (1999). Shaping and cleaning the root canal system: a scanning electron microscopic evaluation of a new instrumentation and irrigation technique. *Journal of Endodontics*, 25, pp. 800-803.

Garcez A.S. *et al* (2006). Efficiency of NaOCl and laser-assisted photosensitization on the reduction of *Enterococcus Faecalis* in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 102, pp. 93–98.

Garcez A.S. *et al* (2008). Antimicrobial effects of photodynamic therapy on patients with necrotic pulps and periapical lesion. *Journal of Endodontics*, 34, pp.138–142.

Garcez A.S. *et al* (2007). Antimicrobial photodynamic therapy combined with conventional endodontic treatment to eliminate root canal biofilm infection. *Lasers in Surgery and Medicine*, 39, pp. 59–66.

Garcia, D., E., (2001). Uso del ácido etilendiamino tetraacético (EDTA) en la terapia endodóntica.[Em linha]. Disponível em http://www.carlosboveda.com/Odontologosfolder/odontoinvitadoold/odontoinvitado_11.htm. [Consultado em 15/12/2010]

Hu, X. *et al.*, (2010). Effects of irrigation solutions on dentin wettability and roughness. *JOE*, 36 (6), pp. 1064-1067.

Hulsmann, M. (1998). Irrigation del conducto radicular: Obejctivos, soluciones y técnica. *Journal of Endodontics*, 4 (1), pp. 15-29.

Kaufman *et al.*,(2005). *Enterococcus spp.in* endodontically treated teeth with or without periradicular lesions. *Journal of Endodontics*, 31 (12) Dec, pp. 851-856.

Lim Z. *et al* (2009). Light activated disinfection: an alternative endodontic disinfection strategy. *Australian Dental Journal*, 54, pp.108–14.

Love R.M. (2001). *Enterococcus faecalis*: a mechanism for its role in endodontic failure. *Internacional Endodontic Journal*, 34, pp.399–405.

Mark Wainwright (2005). The development of phenothiazinium photosensitisers. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2, pp. 263-272. Review.

Siqueira J. *et al.* (2000). Chemomechanical reduction of the bacterial population in the root canal after instrumentation and irrigation with 1%, 2.5%, and 5.25% sodium hypochlorite. *Journal of Endodontics*, 26(6) Jun, pp.331-335.

Soares *et al.*, (2010). Effectiveness of chemomechanical preparation with alternating use of Hypochlorite and EDTA in eliminating intracanal *Enterococcus Faecalis*. *Journal of Endodontics*, 36 (5), pp. 894-898

Soukos N.S. *et al* (2006). Photodynamic therapy for endodontic disinfection. *Journal of Endodontics*, 32, pp. 979–984.

Souza L.C. *et al* (2010). Photodynamic therapy with two different photosensitizers as a supplement to instrumentation/irrigation procedures in promoting intracanal reduction of *Enterococcus faecalis*. *Journal of Endodontics*, 36(2) Feb, pp. 292-296.

Stuart C.H. *et al* (2006). *Enterococcus faecalis*: Its Role in Root Canal Treatment Failure and Current Concepts in Retreatment. *Journal of Endodontics*, 32(2) Feb, pp. 93-98. Review.