

Pedro Coimbra de Almeida Osório de Castro

Biofilmes em endodontia

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2014

Pedro Coimbra de Almeida Osório de Castro

Biofilmes em endodontia

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2014

Pedro Coimbra de Almeida Osório de Castro

Biofilmes em endodontia

Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa
como parte dos requisitos para a obtenção do grau de
Mestre em Medicina Dentária

Sumário

Introdução: Um biofilme é uma comunidade estruturada de células bacterianas envolvidas numa matriz constituída por substâncias poliméricas e aderido a uma superfície sólida. Esta comunidade permite um modo protegido de crescimento que permite a sobrevivência dos constituintes celulares em ambientes hostis e fornece uma tolerância aumentada a agentes antimicrobianos.

Objectivo: Tentar compreender a forma como os constituintes celulares se organizam e ter um melhor conhecimento das formas de resistência antimicrobiana características da organização em biofilmes, como também de rever os métodos actualmente usados para a desinfeção no tratamento endodôntico e abordando métodos alternativos ainda em estudo.

Materiais e métodos: Para tal realizou-se uma pesquisa bibliográfica nos principais motores de busca: *Pubmed*, *B-On*, *SciELO*, *Science Direct*, como também no repositório da Universidade Fernando Pessoa e da Faculdade de Medicina Dentária do Porto utilizando as palavras-chave “*Biofilms*”, “*Apical Periodontitis*”, “*Enterococcus faecalis*” e “*Biofilm Treatment*” que foram associadas de várias formas. Desta pesquisa efectuada, entre Junho de 2014 e Julho de 2014, foram escolhidos 117 artigos em Português e Inglês dos quais foram usados 89.

Resultados: A forma como actualmente procedemos à desinfeção do sistema de canais radiculares, passando pela instrumentação mecânica e irrigação química não é totalmente satisfatória no que toca a uma total erradicação dos microorganismos devido a várias limitações como a complexidade anatómica dos canais e a ecologia presente no interior dos mesmos.

Conclusões: De futuro, terão que ser desenvolvidas outras estratégias antimicrobianas para suplementar as existentes. Embora estas pareçam promissoras *in vitro* elas carecem de estudos *in vivo*, os quais serão necessários no futuro para ultrapassar as várias limitações presentes no sistema de canais radiculares.

Palavras-Chave: *Biofilms; Apical Periodontitis; Enterococcus faecalis; Biofilm Treatment*

Abstract

Introduction: A biofilm is a structured bacterial cell community enveloped in a matrix composed of polymeric substances and attached to a solid surface. This community allows for a protected way of growth that permits the survival of the cellular components in hostile environments and provides a higher tolerance to antimicrobial agents.

Objective: Trying to understand the way cellular components are organized and have a better knowledge of the antimicrobial resistances that are characteristic of the way biofilms are structured, as well as to review the currently used methods for disinfection in an endodontic treatment and to address alternative methods still in study.

Materials and Methods: To this end a bibliographic research was performed on the main search engines: *Pubmed*, *B-On*, *SciELO*, *Science Direct*, and also on Universidade Fernando Pessoa and Faculdade de Medicina Dentária do Porto's repository using "*Biofilms*", "*Apical Periodontitis*", "*Enterococcus faecalis*" and "*Biofilm Treatment*" as key-words that were associated in many forms. From this research performed between June 2014 and July 2014, were selected 117 articles in Portuguese and English and from those, 89 were used.

Results: The way that we currently proceed regarding the disinfection of the root canal system using mechanical instrumentation and chemical irrigation is not fully satisfactory, when it comes to the total eradication of the microorganisms present due to several limitations like the complexity of the root canal anatomy and the ecology present inside the root canal.

Conclusions: In the future, other antimicrobial strategies will have to be developed to supplement the currently used ones. Although these look promising *in vitro* they lack *in vivo* studies, that will be necessary in the future to overcome the several limitations present in the root canal system.

Key-words: *Biofilms*; *Apical Periodontitis*; *Enterococcus faecalis*; *Biofilm Treatment*

Dedicatória

“Um super-herói não tem superpoderes, não está nas manchetes de jornais, não leva ao delírio ou alvoroço as multidões, ele salva o seu próprio mundo a cada novo amanhecer, seguindo a sua jornada na direção dos seus sonhos guiados pelo seu coração.”

WILTON LAZAROTTO

Agradecimentos

Quero aqui expressar os meus agradecimentos a todos aqueles que me apoiaram, encorajaram e ajudaram ao longo deste meu projeto.

À minha orientadora, Professora Doutora Ana Moura Teles, pela sua enorme disponibilidade e atenção dedicada a este trabalho, comentando e criticando nos momentos necessários com simpatia e muita organização.

Aos meus colegas de curso pela amizade, ajuda, cooperação e dedicação.

Aos meus pais e irmão por estarem sempre presentes na minha vida académica, porque sem o apoio e a confiança que depositaram em mim, teria sido mais difícil chegar até aqui.








À minha namorada por ter estado sempre presente em todos os momentos importantes do meu curso e se ter mostrado sempre disponível para me ajudar.

Índice Geral	Página
Índice de Figuras	ii
Índice de Siglas e Abreviaturas	iii
I. Introdução	1
II. Desenvolvimento	2
1. Materiais e Métodos.....	2
2. Biofilmes	2
2.1. Definição, estrutura e formação dos biofilmes.....	2
2.2. Biofilmes e Periodontite Apical	5
2.3. Metodos de identificação microbiana	9
2.4. Comparação entre a infecção primária e secundária/persistente.....	12
2.5. Fatores que influenciam a resistência antimicrobiana	16
3. Opções Terapêuticas para os biofilmes	18
3.1. Efeito de instrumentação	18
3.2. Comparação de várias soluções irrigantes	23
3.3. Agitação mecânica sônica e ultrassônica.....	31
3.4. Terapia fotodinâmica antimicrobiana	33
3.5. Medicação intracanal	36
3.6. Desinfecção assistida por laser.....	38
3.7. Nanopartículas.....	39
III. Conclusão	41
IV. Bibliografia	43

Índice de Figuras

Figura 1. Fases de formação do biofilme	3
Figura 2. Interações nutricionais interbacterianas.....	5
Figura 3. Dinâmica da formação da periodontite apical, devido ao contacto da polpa com microrganismos	6
Figura 4. Diferença da ecologia na porção coronal e apical do canal radicular	7
Figura 5. Locais de interesse para a recolha de microorganismos	9
Figura 6. Filos e bactérias presentes em infeções endodônticas	13
Figura 7. Biofilme bacteriano com diferentes morfologias celulares ampliação de 3500x.....	14
Figura 8. Representação dos diferentes mecanismos envolvidos na resistência antimicrobiana dos biofilmes	16
Figura 9. Limitações das imagens a duas dimensões.....	20
Figura 10. Instrumentação desadequada do canal radicular devido à utilização de sistemas rotatórios	20
Figura 11. Ambas as pontas destas limas são circulares, instrumentando o canal desta forma. Esquerda - Lima K; Direita - Lima de um sistema rotatório de níquel-titânio....	21
Figura 12. A - Vista transversal dos túbulos dentinários B- Vista longitudinal dos túbulos dentinários	21
Figura 13. Desenho das limas SAF	22
Figura 14. Adaptação da lima ao canal radicular, comparado a uma lima K ISSO 30	23
Figura 15. Espaço necessário entre o canal e a agulha durante a irrigação	25
Figura16. Imagem de uma agulha de extremidade fechada por microscopia eletrónica.....	25
Figura 17. A- Biofilme de 4 semanas B- Resíduos de biofilme e células nos túbulos dentinários apos irrigação com NaOCL 2%	27

Índice de Siglas e Abreviaturas

N-acil-l-homoserina lactonas	 AHLs
Universidade Fernando Pessoa	 UFP
Hipoclorito de sódio	 NaOCl
Substância polimérica extracelular	 EPS
Gradiente desnaturante em gel de eletroforese	 DGGE
DNA	 Ácido desoxirribonucleico
Self Adjusting File	 SAF

I. Introdução

Um biofilme é uma comunidade estruturada de células bacterianas envolvidas numa matriz constituída por substâncias poliméricas e aderido a uma superfície sólida. Esta comunidade permite um modo protegido de crescimento que permite a sobrevivência dos constituintes celulares em ambientes hostis e fornece uma tolerância aumentada a agentes antimicrobianos.

O tipo e a disponibilidade de nutrientes são fatores importantes que irão controlar o crescimento microbiano tornando-se importante o conhecimento de como as bactérias se organizam de modo a tomar o maior proveito do ambiente em que se encontram.

A maior parte do conhecimento da microbiota endodôntica é baseada em métodos de cultura. Mas, os métodos de cultura podem subestimar a variedade de espécies numa população microbiana. As técnicas de biologia molecular identificam diretamente microrganismos em amostras sem necessidade de os cultivar.

Os objetivos principais desta revisão bibliográfica são: compreender as várias terapêuticas para os biofilmes, sabendo o efeito da instrumentação, comparando os vários irrigantes, perceber a agitação mecânica sónica e ultrassónica e a terapia fotodinâmica antimicrobiana. Não esquecendo, pois, a medicação intracanal que complementa a instrumentação mecânica e a irrigação química quando estas provam ser insuficientes na desinfecção bacteriana. Também serão abordados os temas da desinfecção assistida por laser e as nanopartículas. Deseja-se também saber se existem fatores nas comunidades bacterianas para resistir a agentes antimicrobianos.

A pesquisa bibliográfica foi feita em diversos motores de busca e ainda para complementar foi utilizado o repositório da Universidade Fernando Pessoa (UFP) e da Faculdade de Medicina Dentária do Porto (FMDUP) no período compreendido entre junho e julho de 2014.

Conclui-se que estudos deverão ser feitos, de modo a ter um melhor entendimento sobre a organização dos biofilmes, os constituintes bacterianos e o modo como estes interagem, para assim serem desenvolvidos métodos de tratamento que possam

ultrapassar as resistências oferecidas pela organização em biofilmes e que impeçam a recolonização bacteriana.

II. Desenvolvimento

1. Materiais e Métodos

A pesquisa bibliográfica foi feita com base em artigos científicos publicados nos últimos 5 anos, nos motores de busca *PubMed*; *SciELO*; *B-On*.; ScienceDirect e ainda para complementar foi utilizado o repositório da Universidade Fernando Pessoa e da Universidade de Medicina Dentária do Porto.

A pesquisa eletrónica foi feita utilizando as palavras-chave: *Biofilms*, *Apical Periodontitis*, *Enterococcus faecalis* e *Biofilm Treatment*.

Da pesquisa obtiveram-se 117 artigos em inglês e português e foram seleccionados, após leitura do resumo 89 artigos com interesse significativo para a elaboração do trabalho.

2. Biofilmes

2.1 Definição, estrutura e formação dos biofilmes

O biofilme é definido como uma comunidade microbiana séssil multicelular caracterizado por células que estão ligadas a uma superfície e enredadas numa matriz de substâncias poliméricas extracelulares (EPS), o que irá permitir uma melhor adaptação a meios hostis e uma maior tolerância a procedimentos antimicrobianos (Costerton, 1999; Siqueira, 2008).

O primeiro passo para a formação de um biofilme, passa pela adesão de bactérias num estado planctónico a uma superfície, sendo então, as primeiras colonizadoras deste processo. A superfície em causa, normalmente, está coberta por um filme

condicionante, tipicamente composto por moléculas orgânicas, que promove a adesão das bactérias. O segundo passo consiste num processo dinâmico em que se formam micro-colónias devido à proliferação das bactérias aderidas à superfície e da coagregação de novas bactérias, começando também a ser formada a matriz de EPS. No terceiro passo, ocorre a formação de macro-colónias rodeadas por canais de água que ajudam a distribuir nutrientes e moléculas de sinalização. Por último, dá-se igualmente, a separação de algumas células bacterianas, normalmente causada por alterações ecológicas no meio oral, ou para colonizar outras superfícies. Uma característica em comum nos biofilmes é a matriz de EPS ser responsável geralmente por 80-85% do volume dos biofilmes (Svensater, 2004; Chávez de Paz, 2007 a; Siqueira, 2008; Dufour 2012).

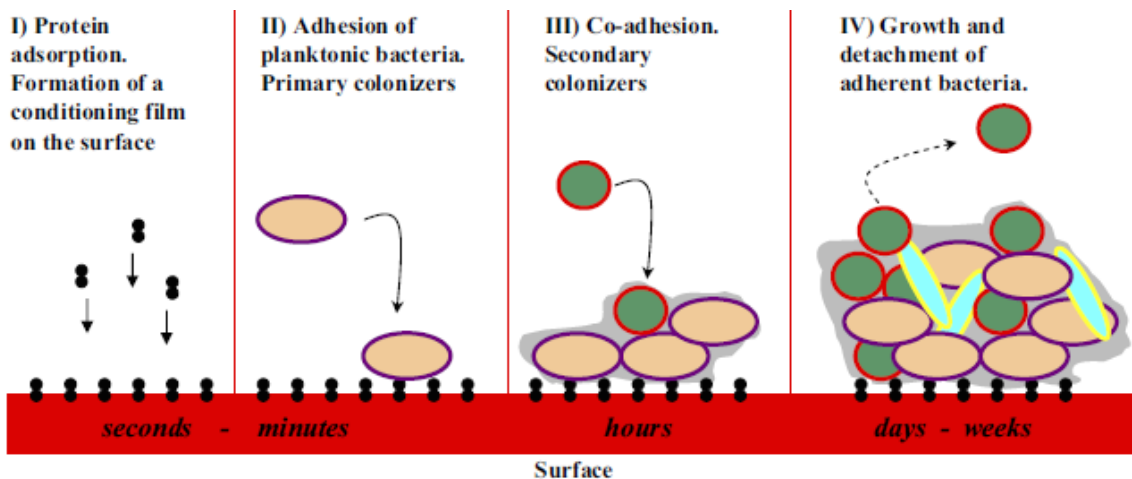


Figura 1. Fases de formação do biofilme (Adaptado de Chávez de Paz, 2007 a).

Estas substâncias são biopolímeros secretados pelas células do biofilme e são normalmente polissacarídeos, embora possam também ser proteínas, ácidos nucleicos e lípidos, que vão ser essenciais para conferir características fundamentais para a sobrevivência da comunidade microbiana, como por exemplo (Flemming, 2010):

- Mediar a adesão dos biofilmes à superfície;
- Estabilizar o biofilme mecanicamente;
- Permitir a acumulação de enzimas extracelulares que irão ajudar na aquisição de nutrientes e degradação de macromoléculas;

- Manter as células do biofilme em proximidade, promovendo o sinergismo patogénico e interações genéticas;
- Servir como fonte de nutrientes, quando estes se encontram escassos no meio;
- Fornecer um microambiente hidratado ao reter água;
- Ter um papel protetor contra as defesas do organismo.

O tipo e a disponibilidade de nutrientes são importantes como fatores que irão guiar o crescimento microbiano. Os nutrientes podem ser provenientes da cavidade oral, do tecido conjuntivo, dos conteúdos dos túbulos dentinários ou de fluidos dos tecidos periapicais (Figdor, 2007).

Os nutrientes exógenos, como os hidratos de carbono, afetam a microbiologia da parte coronal dos canais radiculares, por ser a parte que está em contacto direto com a cavidade oral. Já na parte interior do canal, predominam aminoácidos e peptídeos que promovem o crescimento de microrganismos anaeróbios. Ao longo do tempo, irá ocorrer uma substituição das bactérias anaeróbias facultativas pelas estritas, provavelmente devido a fatores nutricionais e redução da disponibilidade de oxigénio. Embora as bactérias anaeróbias facultativas, dominadas por estreptococos cresçam em ambientes privados de oxigénio, elas dependem, principalmente, de hidratos de carbono como nutrientes, os quais como referido anteriormente provêm do contacto direto com o meio oral, estando, assim, inacessíveis aos microrganismos no interior dos canais radiculares (Figdor, 2007).

O crescimento das populações bacterianas poderá depender de uma cadeia alimentar formada em que o metabolismo de uma espécie poderá fornecer nutrientes para o crescimento de outras. Temos, como exemplo, os bacilos produtores de pigmento negro (*Prevotellas spp.* e *Porphyromonas spp.*), bactérias com requerimentos nutricionais bastante específicos, dependentes de vitamina K e hemina, ambas produzidas por outras bactérias (Figdor, 2007).

No caso da hemina, esta pode ser produzida pela bactéria *Camphylobacter rectus*, que, ao ser estritamente anaeróbia, necessita de uma fonte de hidrogénio que pode ser fornecido pelas *Porphyromonas* spp (Grenier, 1986; Siqueira, 2011).

O conhecimento da cadeia alimentar criada entre os microrganismos leva a que sejam também conhecidas as associações entre os mesmos nos canais radiculares (Figdor, 2007).

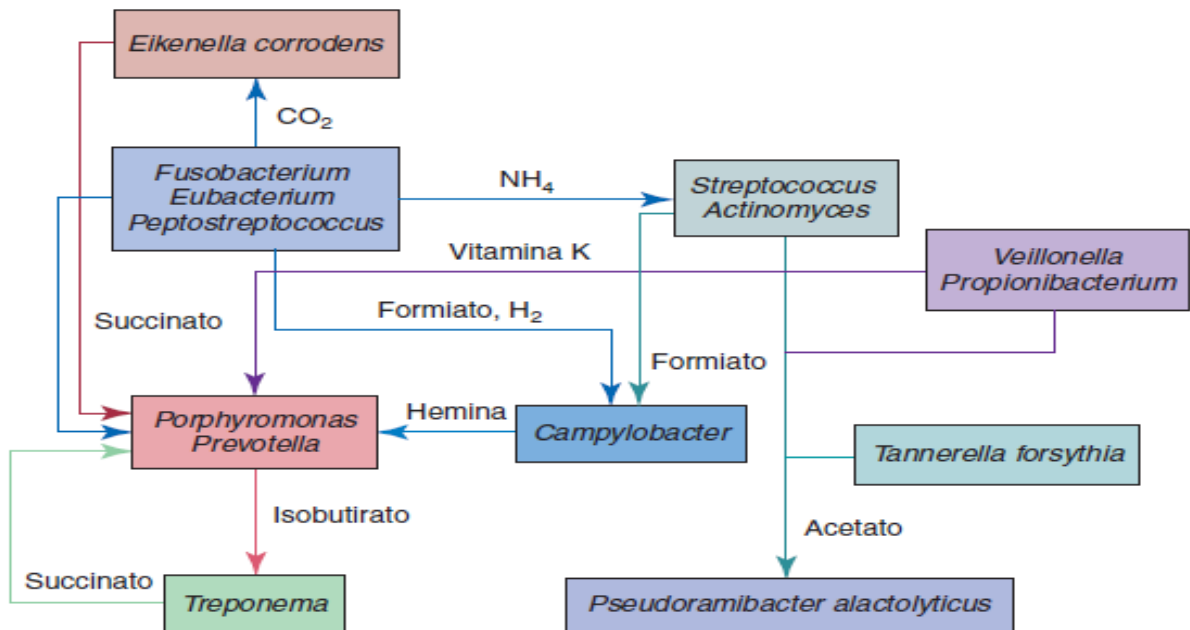


Figura 2. Interações nutricionais interbacterianas (Adaptado de Siqueira, 2011).

2.2. Biofilmes e Periodontite Apical

A primeira observação registada de bactérias nos canais radiculares foi feita no século XVII, pelo cientista holandês Anthony Van Leeuwenhock, usando microscópios simples criados por ele para observar o interior de um dente cariado. Este cientista relatou que o material presente nos canais radiculares continha seres vivos microscópicos, aos quais ele denominou de “animáculos”. Esta observação tornou-o no primeiro cientista a trabalhar com biofilmes, embora a associação de microorganismos com a periodontite apical não tenha sido sugerida até 1894, altura em que Willoughby Dayton Miller, um dentista americano, publicou um estudo a partir de análises

recolhidas dos canais radiculares de dentes que continham bactérias em 3 morfologias distintas conhecidas na altura: cocos, bacilos e espiroquetas (Siqueira, 2011).

A prevalência de cada morfologia variava dependendo da porção do dente (coronal, média ou apical) em que foi recolhida cada amostra. As espiroquetas foram encontradas em alto número nos casos em que existiam abscessos, o que levou a que tenha sido proposto um papel etiológico para estas bactérias. É de salientar que os estudos de culturas recolhidas até metade da década de 70 do século XX recuperavam, predominantemente, microrganismos aeróbios e anaeróbios facultativos, o que visto numa perspetiva histórica, pode ser explicado por fracas técnicas de cultura para bactérias anaeróbias e um procedimento não asséptico de recolha de amostras, factos que levariam a uma cultura com contaminantes presentes os quais não fariam parte da microbiota dos canais radiculares (Dahlén, 2009; Siqueira, 2011).

A hipótese proposta por Miller sobre a doença periodontal estar ligada aos microrganismos foi confirmada por um estudo feito por Kakehashi *et al.* em ratos de laboratório em 2 grupos, um deles composto por ratos estéreis "germ free" e o outro por ratos com uma microbiota convencional. Neste estudo, as polpas dentárias de cada grupo de ratos foram expostas ao meio oral e, face a esta exposição, as únicas polpas que desenvolveram necrose foram as dos ratos convencionais, enquanto as polpas dos ratos estéreis, não só se mantiveram vitais como também mostraram a habilidade de se repararem com a formação de dentina para isolar a polpa do meio oral (Siqueira, 2011).

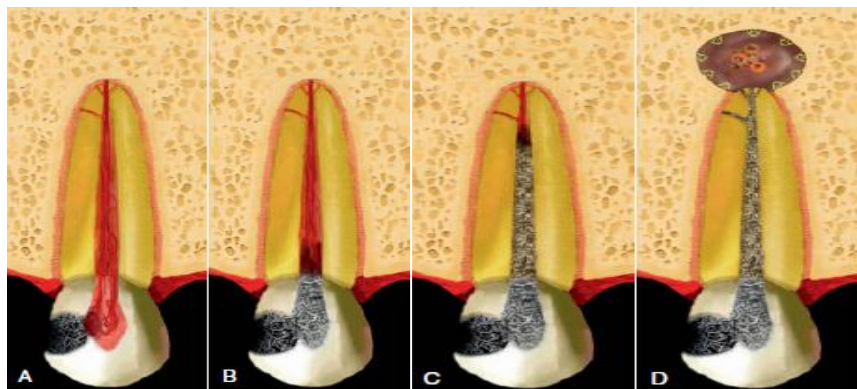


Figura 3. Dinâmica da formação da periodontite apical, devido ao contacto da polpa com microrganismos (Adaptado de Siqueira 2011).

O papel das bactérias como fator etiológico da periodontite apical foi, ainda, confirmado com o estudo de Sundqvist (1976), após encontrar bactérias em canais radiculares necrosados com evidência radiográfica de periodontite apical, comparando-os a canais de polpas também necrosadas, mas que não apresentavam a presença de bactérias nem de doença periodontal. É de salientar que no estudo de Sundqvist, 90% das bactérias recolhidas eram bactérias anaeróbias estritas. Esta investigação serviu também para demonstrar que uma polpa necrosada, porém não infetada, não apresenta a capacidade de induzir e manter as lesões de periodontite apical. A presença de bactérias anaeróbias estritas nos canais radiculares foi mais tarde confirmada por alguns estudos, criados por Moller *et al.* (1981), Bystrom & Sundqvist (1983) e Baumgartner & Falkler (1991). A presença destas bactérias, principalmente na porção apical dos canais, é explicada pela distribuição de nutrientes e da tensão de oxigénio presentes neste local, sendo fatores importantes que servem como “guias ecológicos” (Siqueira, 2011).

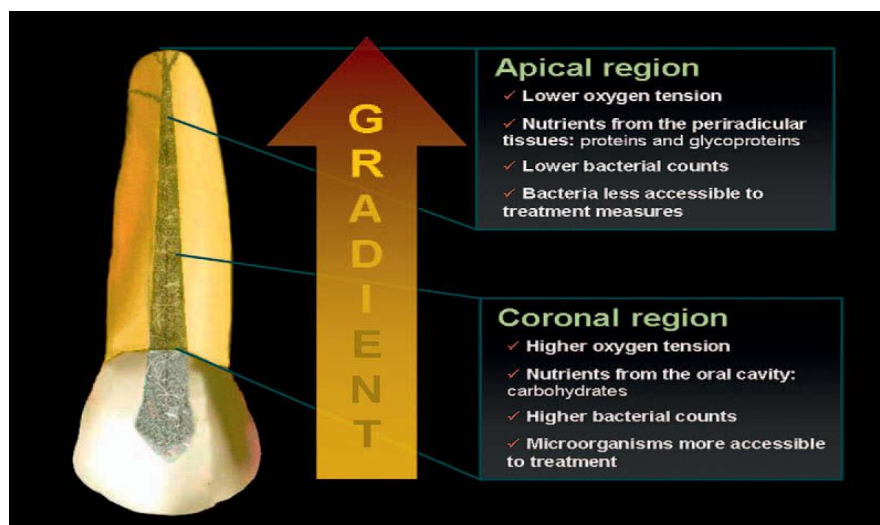


Figura 4. Diferença da ecologia na porção coronal e apical do canal radicular (Adaptado de Siqueira, 2011).

Ramachandran Nair em 1987, analisou microscopicamente, não só a microbiota do canal radicular de dentes humanos com lesão periapical e a relação com a parede dentinária, como também os aspetos morfológicos da interação entre os diversos grupos

de bactérias, sendo pela primeira vez introduzido o conceito de biofilmes em endodontia e a natureza dinâmica da resposta inflamatória do hospedeiro (Nair, 1987).

Num estudo mais recente feito por Parsek & Singh (2003) foram propostos 4 critérios para estabelecer uma relação de causa e efeito entre biofilmes e doenças infecciosas:

- 1) As bactérias infetantes estão aderidas ou associadas a uma superfície;
- 2) O tecido infetado apresenta micro-colónias de bactérias envolvidas por uma matriz de EPS;
- 3) A infeção apresenta-se localizada e embora a disseminação possa ocorrer, esta é considerada como um evento secundário;
- 4) A infeção é resistente a antibióticos, embora as células responsáveis no estado planctónico sejam suscetíveis à eliminação por estes.

Um quinto critério foi acrescentado por Hall-Stoodley & Stoodley (2009), referindo a ineficácia do hospedeiro em remover os biofilmes, justificando este facto pela presença de células inflamatórias em redor das colónias de bactérias presentes no tecido infetado. A presença de neutrófilos e macrófagos *in situ* aumenta a suspeita do envolvimento de biofilmes na origem de uma doença.

Foi ainda proposto, um sexto critério, por Ricucci & Siqueira (2010), afirmando que a rutura ou a eliminação da estrutura do biofilme ou da ecologia do meio leva a uma remissão da doença. Neste trabalho foi, similarmente, confirmado que a periodontite apical preenchia quatro dos seis critérios anteriormente referidos, sendo que o quarto e sexto critério não foram abordados.

Todos estes critérios têm limitações, mas pode-se assumir que eles fornecem características gerais, nas quais podemos considerar que os biofilmes estão na patogénese da doença (Hall-Stoodley & Stoodley 2009; Siqueira, 2012).

2.3. Métodos de identificação microbiana

A maior parte do conhecimento da microbiota endodôntica é baseada em métodos de cultura. A cultura consiste em fornecer aos microrganismos recolhidos em amostra da cavidade oral um meio com os nutrientes e as condições físico-mecânicas necessárias, incluindo temperatura, humidade, atmosfera, concentração de sal e ph (Siqueira, 2009 b; Siqueira, 2011).

Existem várias etapas neste método: colheita e transporte, dispersão, diluição, cultivo, isolamento e identificação. Essencialmente as amostras do meio oral são colhidas e transportadas para o laboratório num meio anaeróbio, sem suporte. São então dispersadas por sonificação ou vórtex, diluídas e distribuídas em vários tipos de meios de agar e cultivadas em meios anaeróbios ou aeróbios. Após esta cultura e de um período de incubação, as colónias individuais são subcultivadas em culturas puras e identificadas de acordo com várias características baseadas em fenótipos como por exemplo a morfologia celular e da colónia, a tolerância ao oxigénio, a coloração de Gram, a caracterização bioquímica e a análise metabólica do produto final por cromatografia gás-líquido (Siqueira, 2009 b; Siqueira, 2011).

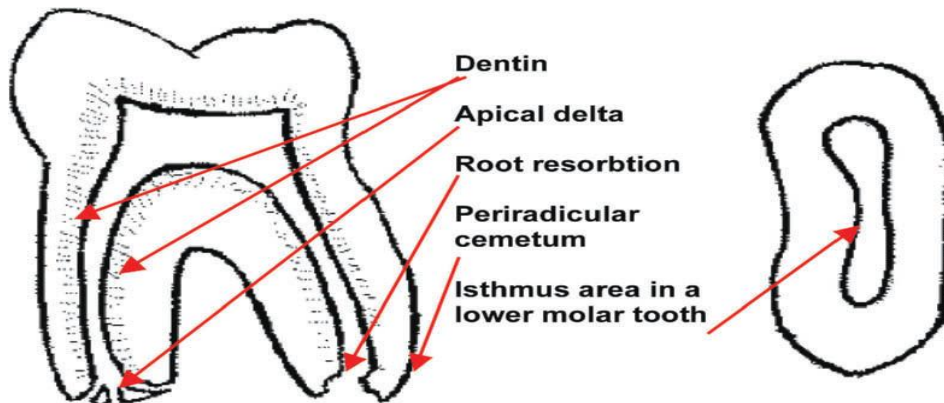


Figura 5. Locais de interesse para a recolha de microorganismos (Adaptado de Dahlén, 2009).

Apesar de este método ser considerado o “*Gold Standard*” para os dentistas na clínica, devido à facilidade de acesso este apresenta várias limitações (Dahlén, 2009; Siqueira, 2011):

- Impossibilidade de cultivar um grande número de espécies de bactérias existentes;
- Nem todas as bactérias viáveis podem ser recuperadas;
- Uma vez isoladas, as bactérias necessitam de identificação utilizando diversas técnicas;
- Baixa sensibilidade;
- Dependência rigorosa do modo de transporte da amostra;
- Amostras requerem processamento imediato;
- Dispendioso, demorado e trabalhoso como no cultivo de anaeróbios;
- Especificidade depende da experiência do microbiologista;
- Grande perícia e equipamento especializado necessário para isolar os anaeróbios;
- São necessários diversos dias ou semanas para identificação da maioria dos anaeróbios.

Devido a estas limitações, os métodos de cultura podem subestimar a variedade de espécies numa dada população microbiana (Siqueira, 2009 b).

Visto que as espécies endodônticas, ainda não identificadas, podem ter um papel relevante a manter a estabilidade e virulência de uma dada comunidade, como também ter um papel na formação e desenvolvimento do biofilme, torna-se relevante aperfeiçoar técnicas que, deste modo, nos permitam conhecer todas as espécies na infecção endodôntica (Hong *et al.*, 2013).

As técnicas de biologia molecular identificam diretamente microrganismos em amostras sem necessidade de os cultivar. Estas técnicas baseiam-se em certos genes que contêm informação sobre a identidade microbiana. O mais usado destes genes é o 16S rRNA

por ser universal nas bactérias, longo o suficiente para conter bastante informação e curto o suficiente para ser facilmente sequenciado (Siqueira, 2011).

Existem diferentes tipos de métodos moleculares para o estudo de microrganismos. O PCR de amplo espectro seguido por clonagem e sequenciamento pode ser utilizado para descobrir a extensão da variedade microbiana num ambiente. As estruturas das comunidades microbianas podem ser analisadas por meio de técnicas de *fingerprinting*, como o gradiente desnaturante em gel de eletroforese (DGGE) e o polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição terminal (T-RFLP). A hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) mede a abundância das espécies-alvo e fornece informação sobre a distribuição espacial nos tecidos. Os agrupamentos de hibridização DNA-DNA (*Checkerboard*, *DNA microarrays* – microagrupamentos de DNA), *single-PCR* (PCR simples) espécie específico, *nested PCR*, *multiplex PCR* e *real-time PCR* (quantitativo em tempo real) podem ser utilizados para pesquisar grandes números de amostras clínicas quanto a presença de espécies-alvo (Siqueira, 2011).

A variedade bacteriana num determinado ambiente é subestimada quando analisada por técnicas que utilizam meio de cultura. Por exemplo, canais radiculares infetados, possuem 10-12 espécies, quando analisadas por estas técnicas, enquanto este nível aumenta para 42-51 em estudos que utilizem métodos de biologia molecular (Siqueira, 2009 b).

As vantagens dos Métodos Moleculares em relação aos outros métodos de identificação microbiana são (Siqueira, 2011):

- Detecção não só de microrganismos cultiváveis, como dos incultiváveis ou fastidiosos;
- Mais especificidade e identificação mais certa de tipos microbianos com comportamentos fenotípicos ambíguos;
- Detecção de espécies microbianas diretamente das amostras clínicas, sem necessidade de cultivo;
- Maior sensibilidade;

- Maior rapidez;
- Diagnóstico rápido;
- Não necessitam de controlos e condições anaeróbicas na recolha e transportação da amostra;
- Podem ser utilizados durante o tratamento antimicrobiano;
- Quando um número grande de espécies precisa de ser analisado, as amostras podem ser guardadas e analisadas de uma só vez;
- Detecção de microrganismos mortos.

Apesar das várias vantagens dos métodos moleculares, estes também têm as suas limitações dando destaque à alta sensibilidade e à deteção de microrganismos mortos que podem ser vistos como vantagens, mas que têm um interesse especial quando os resultados destes métodos são interpretados clinicamente. Relativamente à alta sensibilidade, devido a este método detetar números de células reduzidos de uma determinada espécie, isto poderá levar a que não seja possível determinar a significância dessa espécie no que toca ao aparecimento de uma patologia. Quanto à deteção de células mortas, pode ser visto como uma vantagem, por permitir a deteção de bactérias que podem morrer, durante a colheita, transporte ou isolamento. Por outro lado a deteção de bactérias mortas presentes no local da lesão pode também levar a falsas conclusões sobre o papel destas no processo infeccioso. Outra problemática nesta característica dos métodos moleculares, passa pela investigação da eficácia imediata de alguns tratamentos antimicrobianos intracanalares, não podendo ser avaliada, devido às células recentemente mortas poderem ser detetadas. Devido a isto a deteção de células mortas pode então ser vista simultaneamente como uma vantagem e como uma limitação (Siqueira, 2009 b)

2.4. Comparação entre a infeção primária e a persistente/secundária

As infeções endodônticas podem ser consideradas de acordo com a localização anatómica: intrarradicular ou extrarradicular. Infeção intrarradicular é causada por microrganismos a colonizar o sistema de canais radiculares e pode ser subdividida em três categorias, de acordo com a altura que os microrganismos entraram nesse sistema.

Podem ser infecções primárias causadas por microorganismos que inicialmente invadem e colonizam a polpa necrótica. Podem ser infecções secundárias se forem causadas por microorganismos presentes, não na infecção primária, mas introduzidos no canal radicular após uma intervenção profissional. A infecção persistente é causada por microorganismos que foram membros da infecção primária ou secundária e de alguma maneira foram capazes de resistir aos procedimentos antimicrobianos intracanales e de prevalecer em períodos de privação de nutrientes em canais tratados (Siqueira, 2009 b; Siqueira, 2011).

Mais de 700 espécies bacterianas foram encontradas na cavidade oral agrupadas em 13 filos (*Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria*, *Proteobacteria*, *Spirochaetes*, *Synergistes*, *TM7*, *Sulphur River 1* (SR1), *Chloroflexi*, *Cyanobacteria*, *Deinococcus* e *Acidobacteria*). Destes 13 filos, 9 estão presentes em infecções endodônticas, os quais podem ser vistos na Figura 3 (Siqueira, 2011).

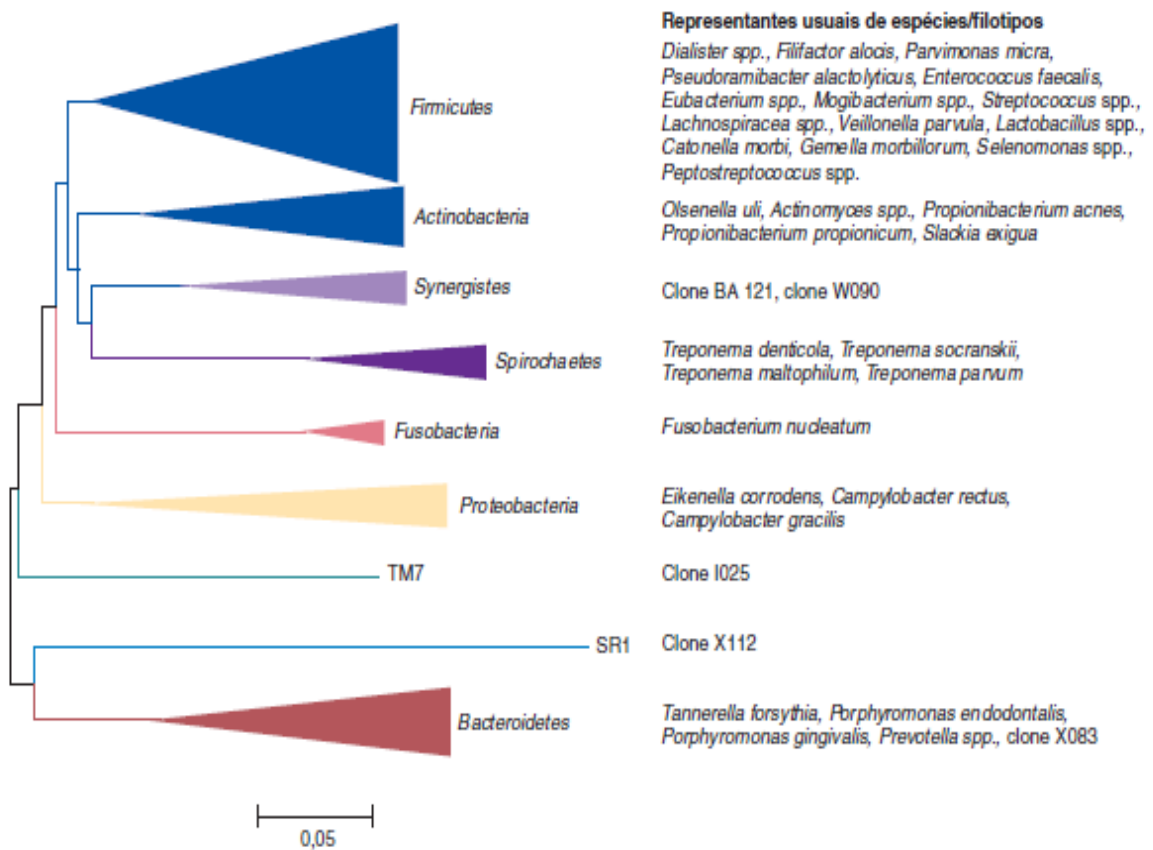


Figura 6. Filos e bactérias presentes em infecções endodônticas (Adaptado de Siqueira, 2011).

Ocasionalmente, Fungos e *Archae* são detetados em infecções intracanales enquanto herpes vírus e HIV podem estar presentes em lesões de periodontite apical (Siqueira, 2009 a).

Devido à polpa dentária ser um ambiente normalmente estéril, qualquer microrganismo encontrado no canal radicular tem o potencial de ser um patogéneo ou de desempenhar um papel na ecologia da comunidade microbiana. O potencial de infecção é deduzido a partir da prevalência em vários estudos de determinadas espécies (Siqueira, 2011; Siqueira, 2012).

Mais de 400 espécies microbianas diferentes foram identificadas a partir de amostras de dentes com diferentes formas de periodontite apical. Estas espécies, normalmente, são encontradas em combinações com grande diversidade nas infecções primárias e pequena diversidade nas secundárias/persistentes (Siqueira, 2012; Tennert *et al.*, 2014).

Segundo Siqueira (2009 a) e Siqueira (2011) nas infecções primárias, as espécies bacterianas, mais prevalentes, pertencem a diversos géneros de bactérias Gram-negativas (*Fusobacterium*, *Dialister*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Tannerella*, *Treponema*, *Campylobacter* e *Veillonella*) e Gram-positivas (*Parvimonas*, *Filifactor*, *Pseudoramibacter*, *Olsenella*, *Actinomyces*, *Peptostreptococcus*, *Streptococcus*, *Propionibacterium* e *Eubacterium*).

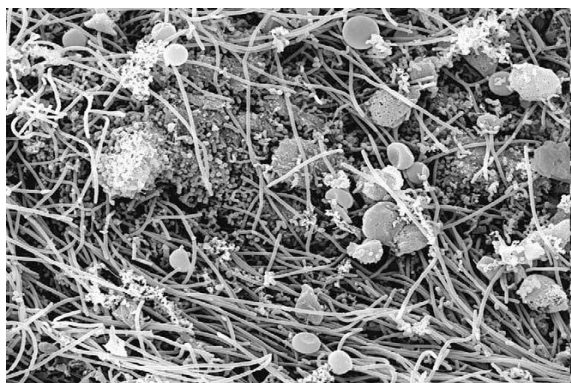


Figura 7. Biofilme bacteriano com diferentes morfologias celulares ampliação de 3500x (Adaptado de Siqueira 2011).

A prevalência bacteriana nas infecções primárias, pode variar de um estudo para outro, em função de diversos fatores, como a sensibilidade e especificidade dos métodos de detecção e identificação, a técnica de colheita, localização geográfica e exatidão ou divergência no diagnóstico clínico e na classificação da doença (Siqueira, 2009 a; Siqueira, 2011).

Uma média de 10 a 20 espécies bacterianas reveladas por estudos moleculares podem ser encontradas por canal em dentes com periodontite apical crônica, existindo uma correlação aparente entre o tamanho da lesão periapical com a diversidade bacteriana no canal sendo esta diretamente proporcional. Canais em dentes com radiolucidez apical associada a fístulas normalmente têm, em média, 17 espécies bacterianas por canal (Teles *et al.*, 2013)

As infecções persistentes e secundárias são, na maioria, clinicamente indistinguíveis. As exceções englobam complicações infecciosas (abscesso apical) que surgem após o tratamento de polpas vitais não infetadas ou casos em que a periodontite apical estava ausente no período do tratamento, mas presente na radiografia de *follow-up*. Ambas as situações são exemplos típicos de infecções secundárias. Tanto as infecções persistentes como as secundárias podem ser responsáveis por: exsudação persistente, sintomas persistentes, *flare-ups* entre consultas e fracasso do tratamento endodôntico, caracterizados por lesão de periodontite apical pós-tratamento (Siqueira, 2009 a; Siqueira, 2011).

Vários estudos de biologia molecular revelaram que o *E. faecalis* é a espécie mais frequente nos canais radiculares de dentes tratados, com valores de prevalência chegando até 90% dos casos. Os dentes submetidos a tratamento endodôntico têm uma probabilidade aproximadamente nove vezes maior de hospedar *E. faecalis*, do que em casos de infecções primárias. Isso sugere que, esta espécie pode ser inibida por outros membros de uma comunidade bacteriana comumente presente em infecções primárias. O fato de o *E. faecalis* ter sido frequentemente encontrado em casos tratados em múltiplas consultas e/ou em dentes abertos para drenagem, sugere que esta espécie pode ser um invasor secundário bem-sucedido em colonizar o canal e resistir ao tratamento,

causando uma infecção secundária que então pode se tornar persistente (Siqueira, 2009 a; Siqueira, 2011).

2.5. Fatores que influenciam a resistência antimicrobiana

Existem diversos fatores nas comunidades bacterianas para resistir a agentes antimicrobianos devido a certos mecanismos causados por peculiaridades no crescimento e na estrutura de um biofilme (Kishen, 2012).

A matriz de EPS dos biofilmes pode atrasar a difusão dos antibióticos, por ligação direta a estes impedindo que se liguem às células bacterianas ou funcionando como uma barreira impermeável. Para além disso, as enzimas extracelulares, tais como β -lactamase, podem ficar concentradas na matriz, inativando assim os antibióticos β -lactâmicos. As células bacterianas que residem dentro de um biofilme têm um crescimento mais lento do que as células planctónicas; levando a uma menor eficácia dos agentes antimicrobianos. O efeito de barreira da matriz é aumentado ainda por substâncias extracelulares, enzimas e constituintes que podem reagir quimicamente com certos agentes microbianos como o iodo, cloro e peroxigénios (Dunavant *et al.*, 2006; Dufour 2012; Kishen 2012).

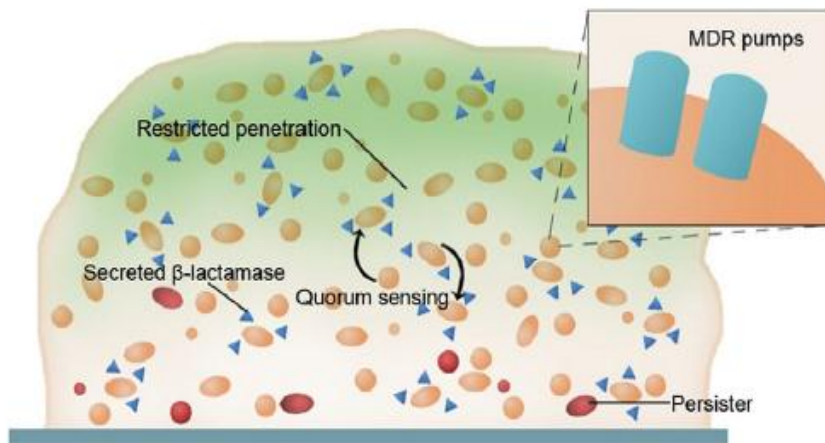


Figura 8. Representação dos diferentes mecanismos envolvidos na resistência antimicrobiana dos biofilmes (Adaptado de Dufour, 2012).

A maturidade de um biofilme contribui também para a sua resistência antimicrobiana, devido à distribuição espacial das células bacterianas. As camadas mais profundas do biofilme apresentam uma atividade metabólica reduzida, uma vez que têm uma quantidade de nutrientes e oxigênio limitadas. Devido aos antibióticos convencionais tenderem a interferir com a replicação e translação do DNA (ácido desoxirribonucleico), são mais eficazes contra as bactérias superficiais com uma atividade metabólica aumentada (Høiby *et al.*, 2010; Dufour, 2012).

Um dos mecanismos de resistência antimicrobiana passa também pela formação de células num estado de dormência (crescimento muito lento ou inexistente) chamadas de *persister*. Estas células são variantes fenotípicas da população celular geral com o objetivo de sobreviver a condições de stress e a concentrações elevadas de antibióticos, durante o tratamento e a proliferarem na presença de nutrientes disponíveis após o final deste (Dufour, 2012; Kishen, 2012).

Outro fator importante para a resistência antimicrobiana consiste na forma como as células comunicam entre si. A maneira de comunicação que pode ser interbacteriana ou intrabacteriana nos biofilmes tem o nome de “*Quorum sensing*” e está presente nas bactérias Gram-positiva e negativa como um sistema que permite às bactérias funcionar coletivamente. Este sistema baseia-se na produção, libertação e deteção de moléculas sinalizadoras denominadas de auto-indutoras, reguladas pela densidade celular (Lazar, 2011).

Dois tipos predominantes de moléculas auto-indutoras são usadas, N-acil-l-homoserina lactonas (AHLs) pelas bactérias Gram-negativas e os peptídeos modificados pós-translacionalmente pelas bactérias Gram-positivas. Estas moléculas após serem libertadas são responsáveis pela expressão de uma série de genes que tornam as células do biofilme mais resistentes às condições de stress e a substâncias antimicrobianas (Lazar, 2011; Siqueira, 2011).

Esta expressão genética ocorre quando a densidade celular chega a um limiar no qual os auto-indutores levam à diferenciação celular para diferentes fenótipos, normalmente

associados a comportamentos virulentos. Os genes expressados por células em biofilmes podem variar de 20 até 70% dos genes expressados em células num estado planctônico. Alguns agentes patogênicos mantêm-se num estado dormente até atingirem um número de células suficiente, de modo a quando expressarem a sua virulência, esta se possa sobrepor à resposta imunitária do hospedeiro (Kalia, 2012; Siqueira 2012 b)

Um dos mecanismos chave para a resistência antimicrobiana, passa também pela existência de bombas de efluxo, responsáveis por regularem o ambiente interno dos microorganismos ao bombear solutos, como agentes antimicrobianos, metabolitos e moléculas do *Quorum sensing*. Estas bombas podem ser formadas por um componente ou por vários sendo estas últimas exclusivas às bactérias Gram-negativas (Soto, 2013).

Também, alterações químicas para o ambiente do biofilme, como a falta de oxigênio, inibem alguns antibióticos, levando a uma diferença de pH que tem um efeito antagonizante do antibiótico (Athanasiadis, 2007).

3. Opções terapêuticas para os biofilmes

3.1. Efeito da instrumentação

O objetivo do tratamento endodôntico passa por prevenir o aparecimento da periodontite apical, ou em casos onde esta esteja presente, fornecer condições apropriadas para a regeneração dos tecidos afetados. Para este fim e, devido à etiologia da periodontite apical, torna-se fundamental eliminar ou reduzir substancialmente a população microbiana dentro do sistema de canais radiculares. Atualmente, os métodos principais usados para conseguir este objetivo são a instrumentação mecânica e a irrigação química (Siqueira, 2011; Lin, 2013).

O objetivo da instrumentação mecânica consiste em dar uma geometria adequada aos canais, promover o acesso das soluções irrigantes e tornar possível a obturação com um material de alta qualidade. Embora a instrumentação mecânica seja o método principal de redução bacteriana no canal radicular infetado, por si só não é o suficiente, tendo de

ser completada pela irrigação, a qual facilita a remoção de tecido necrótico e previne a acumulação de detritos infetados na porção apical do canal. (Haapasalo, 2012; Lin, 2013).

No que se refere à instrumentação, o aparecimento de sistemas rotatórios com limas de níquel-titânio levou a uma grande melhoria na modelação dos canais radiculares, especialmente nos curvos, embora seja importante salientar que não existe uma diferença significativa relativamente à eficácia na remoção de bactérias entre estes sistemas e os sistemas manuais. Alguns estudos, como o efetuado por Dalton *et al.* e o estudo por Nair *et al.* compararam a capacidade de remoção bacteriana, entre limas de aço inoxidável manuais e instrumentos rotatórios de níquel-titânio, não apresentando diferenças significativas entre os dois métodos (Siqueira *et al.*, 2002; Haapasalo, 2012).

Um dos fatores que limitam a eficácia na remoção bacteriana nos sistemas rotatórios de níquel-titânio passa pela geometria do canal, sendo os canais longos e ovais os mais difíceis de instrumentar (Haapasalo, 2012).

Um canal longo e secção oval pode ter um diâmetro máximo transversal 2 a 4 vezes maior que o diâmetro mínimo (Siqueira *et al.*, 2010).

Este fator torna-se pertinente, devido ao facto da morfologia oval ou plana no terço apical canalar poder estar presente até 25% dos canais radiculares, podendo esta percentagem exceder os 50% em certos grupos de raízes nos 5 mm apicais nomeadamente nos pré-molares maxilares com apenas um canal, nos incisivos mandibulares e nos molares maxilares e mandibulares que apresentam somente 1 canal mesial (Wu *et al.*, 2000).

A área de maior diâmetro ou a assimetria nestes canais está, normalmente, associada à dimensão bucolingual do canal, o que leva a que não seja possível ser identificada numa radiografia, devido a esta nos dar uma projeção baseada nessa dimensão raiz (Metzger *et al.*, 2011; Siqueira *et al.*, 2010).

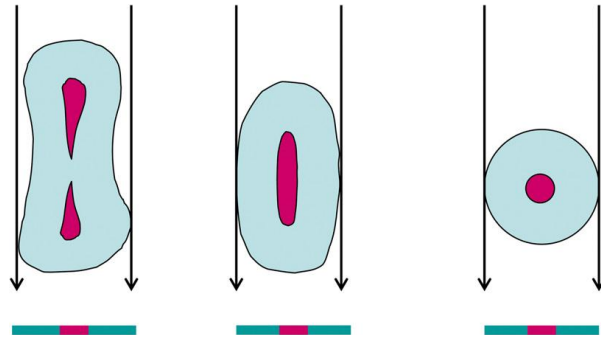


Figura 9. Limitações das imagens a duas dimensões (Adaptado de Metzger *et al.*, 2011).

Esta limitação aliada ao facto de os sistemas rotatórios de níquel-titânio darem uma conformação esférica ao canal pode levar a uma projeção radiográfica em que o canal aparente estar bem obturado, quando na verdade existe a possibilidade da permanência de detritos e tecido infetado na zona lingual/palatina e bucal, interferindo, assim, com a qualidade da obturação e podendo servir de fonte bacteriana para uma infeção persistente. As tentativas de usar instrumentos de um maior diâmetro para tentar corrigir este erro levarão a um estreitamento localizado do resto da parede dentinária aumentando o risco de fraturas verticais na raiz (Metzger *et al.*, 2011; Siqueira *et al.*, 2010).

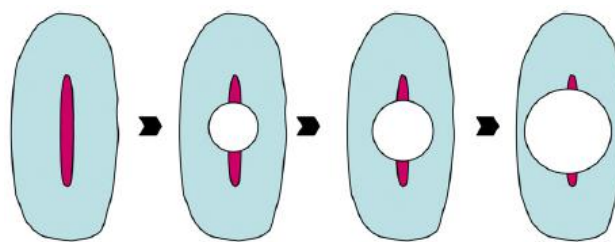


Figura 10. Instrumentação desadequada do canal radicular devido à utilização de sistemas rotatórios (Adaptado de Metzger *et al.*, 2011).

No que toca a outros fatores limitativos, temos a anatomia dos canais radiculares que, devido à existência de complexidades como canais acessórios, canais laterais,

anastomoses e ramificações apicais que irão dificultar a instrumentação, poderão deixar 30-50% do canal por instrumentar (Kishen, 2012).



Figura 11. Ambas as pontas destas limas são circulares, instrumentando o canal desta forma. Esquerda - Lima K; Direita - Lima de um sistema rotatório de níquel-titânio (Adaptado de Metzger, 2011).

Outra limitação passa pelo facto de as bactérias poderem penetrar até 200 μm nos túbulos dentinários, levando, deste modo, a que seja necessário um alargamento uniforme do canal até essa distância, facto que parece ser um objetivo inatingível pelos meios até agora descritos podendo ser comprovado pelo estudo de Paqué et al. 2010 em que mais de 50% dos canais radiculares longos ovais de raízes distais de molares mandibulares não tinham sido instrumentados além de 34 μm por instrumentos rotatórios de níquel-titânio.

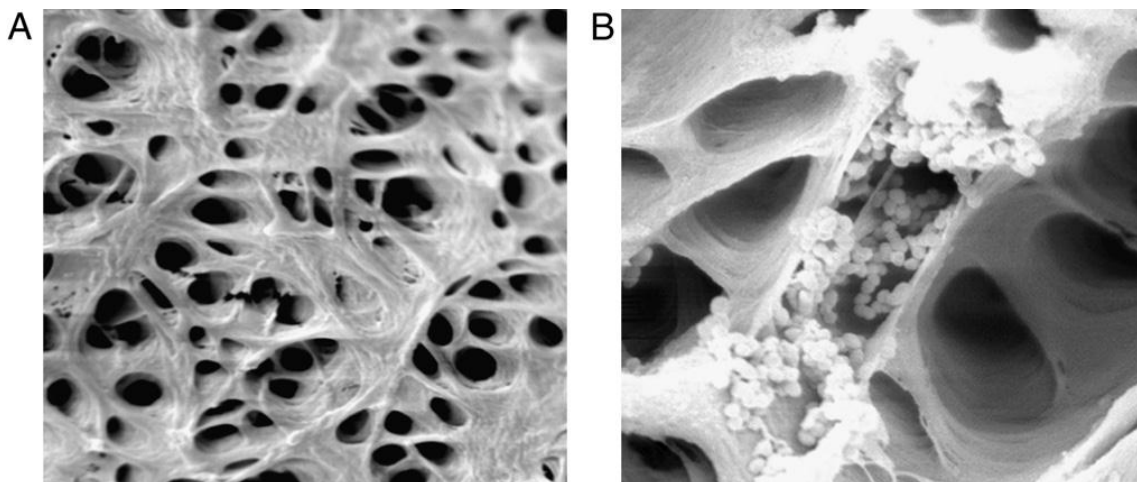


Figura 12. A - Vista transversal dos túbulos dentinários B- Vista longitudinal dos túbulos dentinários (Adaptado de Delgado *et al*, 2010).

A Self Adjusting File (SAF) foi desenhada com o objetivo de solucionar os insucessos das limas tradicionais rotatórias, ao remover camadas uniformes de dentina de modo a preservar a geometria do canal. A capacidade de se adaptar à secção transversal do canal radicular é crucial e é conseguida devido à lima normalmente de 1.5 mm de diâmetro, ser substancialmente comprimida de modo a que assuma dimensões semelhantes às de uma lima K-20. Devido à tendência da lima para voltar à posição inicial, esta exerce uma força circunferencial que, combinada com a superfície abrasiva da mesma, fará com que a dentina seja removida das paredes dos canais radiculares. É recomendado um tempo de uso total no canal de 4 minutos, visto que o alargamento canalar ocorre maioritariamente nos primeiros 2 minutos sendo a duração de cada ciclo, e a lima vai perdendo a capacidade de remoção dentinária devido à perda de pressão nas paredes após este tempo em que o canal foi alargado (Metzger *et al.*, 2010; Hof *et al.*, 2010).

Devido ao desenho oco da lima, é possível combinar a instrumentação mecânica com um fluxo de irrigante contínuo distribuído e trocado pelas vibrações e movimentos da lima de modo a que a remoção dos detritos e bactérias seja mais eficaz. Estudos feitos sobre a comparação deste tipo de limas com os sistemas rotatórios previamente discutidos, demonstram uma menor percentagem de áreas não instrumentadas em dentes anteriores e molares (Peters *et al.*, 2010; Paqué *et al.*, 2010; Metzger *et al.*, 2011).



Figura 13. Desenho das limas SAF (Adaptado de Siqueira *et al.*, 2010)

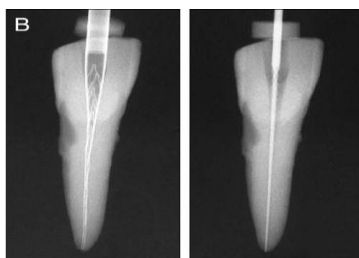


Figura 14. Adaptação da lima ao canal radicular, comparado a uma lima K ISO 30 (Adaptado de Metzger *et al.*, 2010).

Num estudo conduzido por Siqueira *et al.* com o objetivo de eliminar biofilmes de *E. faecalis* em dentes extraídos, a SAF demonstrou ser mais eficaz que os sistemas rotatórios, removendo as colónias de bactérias em 80% dos dentes, enquanto os sistemas rotatórios eliminaram em 45%. (Siqueira *et al.*, 2010)

Apesar destas limas não conseguirem instrumentar todas as irregularidades anatómicas como as ranhuras e sulcos apicais, estas demonstram uma superioridade relativamente à desinfeção dos canais, podendo ser explicada pela irrigação contínua nestes acoplada ao movimento da lima, permitindo aos irrigantes aceder a áreas não instrumentadas (Lin *et al.*, 2013).

3.2. Comparação de várias soluções irrigantes

Devido à instrumentação mecânica, por si só não ter a capacidade de remover completamente as bactérias do sistema de canais radiculares, esta terá de ser assistida por um irrigante químico (Haapasalo, 2012).

Os irrigantes endodônticos são essencialmente agentes antimicrobianos numa fase líquida e a forma como eles são distribuídos pelos canais é denominada de irrigação. A irrigação, quimicamente, tem como objetivo inativar os biofilmes bacterianos, inativar as endotoxinas e dissolver o tecido orgânico dos canais infetados e será influenciada

pelo tempo e concentração do irrigante nos canais. Fisicamente, a irrigação tem como objetivo separar o biofilme da superfície dentinária e impedir a acumulação de detritos nos canais radiculares, sendo influenciada pelas forças do fluxo e refluxo dos irrigantes (Kishen, 2012).

A eficácia da irrigação é influenciada por diversos fatores, tais como a profundidade em que a agulha é inserida no canal, a pressão da irrigação, o diâmetro da agulha e o diâmetro do canal radicular e a viscosidade do irrigante (Metzger, 2011).

É importante que a agulha seja inserida o mais próximo possível do limite do comprimento de trabalho de modo a poder eliminar o maior número de bactérias possível. Num estudo conduzido *in vitro* ficou demonstrado que uma agulha introduzida a 1mm do comprimento de trabalho era mais eficaz a eliminar bactérias do que uma agulha introduzida a 6mm. Contudo, é importante ter em atenção a pressão exercida ao expelir o irrigante devido à possibilidade da extrusão deste para os tecidos periapicais (Sedgley *et al.*, 2005).

O diâmetro da agulha é um fator a ter em conta, tendo este de ser inferior ao diâmetro do canal em causa de modo a que o refluxo do irrigante possa ocorrer e este ser expulso do canal. O menor diâmetro recomendado numa agulha para irrigação é de calibre 30 o que corresponde a uma lima ISO 30 o que leva a que o canal deva ser instrumentado até a lima 35 ou 40 para que esta agulha possa ser usada na maior profundidade possível (Schäfer, 2007).

Uma maneira de reduzir o risco de extrusão passa também pelo uso de agulhas de extremidade fechadas, com aberturas laterais para a expulsão do irrigante (Psimma *et al.*, 2013).

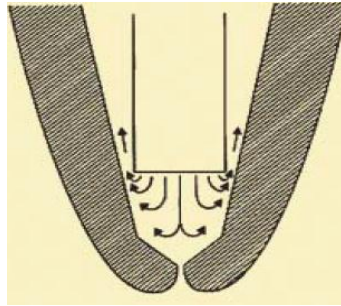


Figura 15. Espaço necessário entre o canal e a agulha durante a irrigação (Adaptado de Schäfer, 2007).

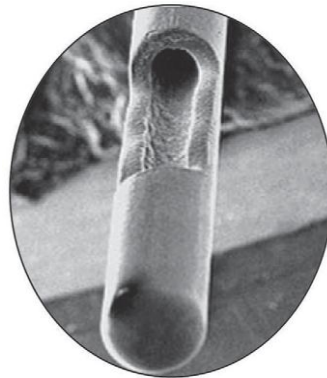


Figura 16. Imagem de uma agulha de extremidade fechada por microscopia eletrônica (Adaptado de Metzger, 2011).

Historicamente, várias soluções foram sugeridas e usadas como irrigantes. Um irrigante deve ter como características ideais, um largo espectro antimicrobiano, a habilidade de dissolver restos da polpa necrótica, prevenir a formação ou eliminar a *smear layer* existente, não manchar as estruturas dos dentes, permanecer estável em solução e ter uma toxicidade baixa ou inexistente para os tecidos periodontais (Zehnder, 2006; Metzger, 2011).

O hipoclorito de sódio (NaOCl) é o irrigante mais frequentemente usado. Numa solução aquosa o NaOCl ioniza num íon sódio (Na^+) e num íon hipoclorito (OCl^-), o qual é

responsável pela formação do ácido hipocloroso responsável pela atividade antibacteriana (Haapasalo, 2012).

Este ácido tem a capacidade de dissolver tecido orgânico como o tecido pulpar necrosado ou vital e os componentes orgânicos da dentina e biofilmes (Metzger, 2011).

Vários fatores são responsáveis por influenciar a eficácia do NaOCl, nomeadamente a concentração, o volume, a temperatura e o tempo de exposição do NaOCl no canal radicular irrigado (Metzger, 2011).

Um aquecimento de soluções de NaOCl parece melhorar a habilidade de dissolver tecidos orgânicos, como também de erradicar células bacterianas de *E. faecalis*, sendo que, num intervalo de temperatura de 5 a 60 graus Celsius, o aumento de 5 graus irá aumentar mais que duas vezes o efeito bactericida das soluções de hipoclorito; não obstante, e, apesar da baixa condutividade térmica da dentina, algum cuidado é necessário, com a transferência de calor para os tecidos periodontais os quais poderão ser danificados (Sirtes *et al.*, 2005).

Num estudo recente conclui-se que a erradicação de *E. faecalis* na dentina infetada é dependente do tempo de exposição ao hipoclorito; contudo, a partir dos 10 minutos de exposição o efeito bactericida é consideravelmente mais lento, sendo o período mais rápido de erradicação de bactérias nos primeiros 3 minutos (Tianfeng *et al.*, 2014).

Num estudo conduzido por Retamozo *et al.* concluiu-se que a forma mais eficaz de eliminar *E. faecalis*, seria com uma exposição de 40 minutos de NaOCl numa concentração de 5.25%. Porém, isto pode ser prejudicial para a dentina, reduzindo a resistência à fratura, como também o módulo de elasticidade, e dissolvendo conteúdos de carbono e nitrogénio. Por esta razão é necessário equilibrar a eficácia da capacidade antibacteriana do hipoclorito com o dano causado na dentina (Marending *et al.*, 2007; Retamozo *et al.*, 2010).

Relativamente à concentração do NaOCl, esta normalmente varia entre 0,5% e 6%, e o aumento do efeito bactericida é diretamente proporcional ao aumento da concentração. Clegg *et al.* realizaram um estudo *in vitro* comparando a eficácia de diferentes concentrações de NaOCl, a 1%, 3% e 6%, aplicadas durante 15 minutos num biofilme polimicrobiano, em que somente a concentração de 6% foi capaz de eliminar a presença de bactérias no canal. A concentração de 3% demonstrou ser também eficaz na remoção do biofilme, mas a presença de bactérias continuou detetável após métodos de cultura em amostras de dentina recolhidas. (Clegg *et al.*, 2006).

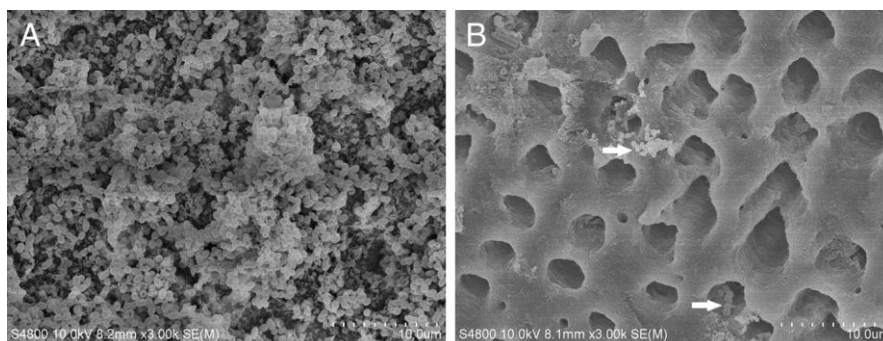


Figura 17. A- Biofilme de 4 semanas B- Resíduos de biofilme e células nos túbulos dentinários apos irrigação com NaOCL 2% (Adaptado de Wu *et al.*, 2014).

Um aumento da concentração do NaOCl ajuda também na penetração do irrigante na dentina, sendo particularmente útil em casos de retratamento ou de lesões de longa duração em que as bactérias se encontram localizadas mais profundamente nos túbulos dentinários (Wong, 2014).

Apesar dos bons resultados *in vitro*, a eficácia do NaOCl *in vivo* é menor, possivelmente explicada pela dificuldade de penetração do irrigante em certas partes do canal radicular como anastomoses ou canais laterais, como também pela presença de exsudato da região periapical, tecido pulpar ou colagénio (Haapasalo, 2011).

A presença da “*smear layer*” também irá contribuir para uma diminuição da eficácia do NaOCl, podendo servir como uma barreira física impedindo a passagem do irrigante, ou simplesmente por inativá-lo parcialmente após a passagem deste (Wang, 2013).

Alguns casos de hipersensibilidade ao NaOCl podem ocorrer, ou dermatites de contacto, porém alergias reais a este irrigante são raras, devido ao sódio e ao cloro, os constituintes principais, serem elementos essenciais na fisiologia humana. (Metzger, 2011).

A Clorexidina é uma bisbiguanida catiónica, com um largo espectro de atividade antibacteriana e uma baixa toxicidade, com uma boa eficácia contra bactérias Gram negativas e Gram positivas encontradas nas infeções endodônticas, podendo ser usada em forma líquida ou em forma de gel. As células de carga positiva na clorexidina interagem com as células de carga negativa da membrana citoplasmática, provocando uma perda dos constituintes o que leva a que esta se torne permeável, inibição das enzimas presentes e precipitação dos constituintes intracelulares também ocorrem. Dependendo do aumento da concentração a clorexidina pode funcionar como um bacteriostático ou como um bactericida (Metzger, 2011; Roças, 2011; Shen, 2011)

A erradicação dos microorganismos tal como com o NaOCl é dependente da concentração e do tempo de interacção da Clorexidina com o canal radicular bem como do ph do canal radicular sendo o potencial antimicrobiano maximizado num ph de entre 5.5-7.0. A adição de um agente modificador de superfície, para reduzir a tensão superficial e aumentar a molhabilidade é também benéfico nos efeitos antimicrobianos devido a aumentar a penetração da clorexidina nos biofilmes (Shen, 2011; Agrafioti *et al.*, 2013).

Visto que o NaOCl é o irrigante mais frequentemente usado, os estudos de eficácia da clorexidina são normalmente feitos em comparação ao NaOCl. Em geral não existe uma diferença significativa na eliminação de microorganismos entre as duas soluções numa concentração semelhante (Metzger, 2011).

Por este motivo, torna-se importante considerar outras propriedades relativamente à escolha do irrigante. A clorexidina tem substantividade na dentina, o que faz com que ocorram efeitos antimicrobianos residuais durante dias ou até mesmo semanas. Contudo, o NaOCl tem a propriedade de dissolver os tecidos orgânicos o que é essencial

para a limpeza dos canais radiculares. De modo a otimizar o tratamento e usar estas duas propriedades, é aconselhado usar o NaOCl na instrumentação seguido por uma irrigação final com clorexidina, contudo a interação destes dois irrigantes faz com que seja instantaneamente formado um precipitado funcionando quase como uma smear layer criada quimicamente que irá reduzir a permeabilidade dentinária, pelo que se recomenda a irrigação com soro fisiológico ou álcool após a irrigação com NaOCl para remover os vestígios deste antes da aplicação da clorexidina (Roças, 2011; Giampiero *et al.*, 2012).

Embora mencionada como sendo uma solução segura, a clorexidina pode induzir reações alérgicas. A frequência de sensibilização foi indicada como sendo aproximadamente de 2%. Anafilaxia, dermatite de contato e urticária foram relatadas após contacto directo com tecido mucoso ou com feridas abertas. Não houve relatos de reacções alérgicas após a irrigação com clorexidina (Metzger, 2011).

Embora não exista uma diferença significativa entre os resultados encontrados na literatura sobre a eficácia antimicrobiana entre a Clorexidina e o NaOCl, a primeira poderá ter vantagens em relação à segunda devido ao grande potencial antimicrobiano em eliminar biofilmes compostos de *E.faecalis* aliado, graças à substantividade deste irrigante à elevada penetração nos túbulos dentinários e à capacidade de impedir a recolonização dos biofilmes devido ao efeito antimicrobiano prolongado (Metzger, 2011).

Os agentes quelantes foram introduzidos na endodontia com o objetivo de facilitar a preparação dos canais estreitos e calcificados, ao remover os componentes inorgânicos da “smear layer”, sendo usados como irrigantes finais. Destes produtos o EDTA é o mais frequentemente usado (Kim *et al.*, 2013).

Este irrigante é normalmente usado a uma concentração de 17%, e tem a capacidade de dissolver a “smear layer” quando em contacto directo, em menos de um minuto. O EDTA apesar de ter uma capacidade asséptica limitada, é capaz de remover biofilmes,

aderidos às paredes dos canais radiculares, reduzindo assim a população bacteriana intracanal (Metzger, 2011).

Devido ao EDTA remover os componentes inorgânicos da “*smear layer*”, e o NaOCl remover os componentes orgânicos, leva a que seja fundamental a utilização combinada destes irrigantes. Contudo, a interação de agentes quelantes com o NaOCl, fazem com que a eficácia antimicrobiana seja reduzida, devido à formação de gás cloro, levando à menor disponibilidade de cloro livre na solução. Em contrapartida, a degradação do EDTA em presença do NaOCl é extremamente lenta, o que não põe em risco a eficácia clínica do EDTA, devendo, então, os irrigantes serem usados separadamente para uma melhor eficácia clínica (Metzger, 2011; Giampiero *et al.*, 2012).

Outro irrigante usado é o MTAD introduzido em 2003, composto por 3% de hclato de doxicilina (antibiótico), 4,25% de ácido cítrico e 0,5% de polissorbato-80 (detergente). Este irrigante é o primeiro a conseguir eliminar a “*smear layer*” e a desinfetar o canal radicular. O Tetraclean[®] é um irrigante semelhante mas com uma concentração de doxicilina 3 vezes inferior e um detergente usado diferente (propileno glicol) (Metzger, 2011).

Num estudo conduzido por Giardino *et al.* a eficácia antimicrobiana destes 2 irrigantes foi comparada à do NaOCl a 5,25% num biofilme de *E. faecalis*, sendo o NaOCl o único capaz de remover completamente o biofilme passado 5 minutos, seguido em eficácia pelo Tetraclean[®], capaz de atingir os mesmos resultados volvidos 60 minutos. Os melhores resultados do Tetraclean[®] em relação ao MTAD, apesar deste ter uma concentração de antibióticos 3 vezes inferior, podem ser explicados pelo efeito sinérgico com o detergente usado. Num estudo por Pappen *et al.* o Tetraclean[®] provou novamente ser mais eficaz que o MTAD na remoção de um biofilme polimicrobial com 2 semanas de maturidade. (Giardino *et al.*, 2007; Pappen *et al.*, 2010).

De todos os irrigantes atualmente usados, o NaOCl apresenta o maior número de requisitos para ser um irrigante ideal e tem a capacidade única de dissolver tecidos orgânicos, sendo fundamental para a eliminação de biofilmes, devendo ser o irrigante

principal usado na preparação químico-mecânica dos canais radiculares (Metzger, 2011).

Em estudos feitos com biofilmes de *E. faecalis* o NaOCl a 6% apresentou os melhores resultados na erradicação bacteriana, sendo estes resultados influenciados pelo tempo de contacto da solução com as bactérias e da maturidade do biofilme em causa, visto que os biofilmes maduros apresentam uma maior resistência (Wang, 2012; Tianfeng *et al.*, 2014).

3.3. Agitação mecânica sónica e ultrassónica

A preparação químico-mecânica dos canais radiculares é o método principal de desinfeção dos canais radiculares, contudo esta preparação, por si só, não é suficiente para a erradicação completa dos biofilmes em alguns casos, podendo as bactérias remanescentes pôr o tratamento endodôntico em risco. Por este motivo, alternativas a este método ou formas suplementares de tratamento tornam-se importantes para uma melhor desinfeção dos canais radiculares (Simone *et al.*, 2013)

A hidrodinâmica dos irrigantes nos canais radiculares tem um papel importante na eficácia da desinfeção, sendo esta influenciada pela introdução e agitação do irrigante no canal. A introdução tradicional do irrigante com a agulha distribui a solução cerca de 0 a 1,1 milímetro além da ponta da agulha, sendo insuficiente para uma irrigação completa da anatomia complexa do sistema de canais radiculares. Devido a esta problemática, outros mecanismos para distribuir o irrigante têm sido propostos, nomeadamente a agitação mecânica sónica ou ultrassónica (Mancini *et al.*, 2013).

A agitação sónica foi mencionada, pela primeira vez, em 1985. A agitação sónica difere da ultrassónica, no sentido de funcionar a uma frequência menor (1-10 kHz) levando, por outro lado, a uma amplitude maior e à produção de menor tensão de cisalhamento que a ultrassónica. Esta agitação tem provado ser um método eficaz para a desinfeção dos canais radiculares, sendo capaz de remover detritos dos canais laterais, remover a “*smear layer*” e causar a rutura de biofilmes em canais curvos de dentes molares, sendo

10 mil ciclos por minuto sugeridos para otimizar estes efeitos (Tronstad *et al.*, 1985; Haapasalo, 2012).

Por sua vez, a agitação ultrassônica opera a uma frequência de 25 a 30 kHz que está além da audição humana. As limas nesta agitação vibram segundo uma onda gerada, a qual tem áreas de máximo deslocamento (antinodos) e áreas sem deslocamento (nodos) (van der Sluis *et al.*, 2007).

Durante a agitação ultrassônica, dois fenômenos ocorrem no irrigante, nomeadamente a cavitação e a corrente acústica. A corrente acústica está relacionada com o movimento do irrigante num vórtex em redor do objeto que sofre as vibrações enquanto a cavitação consiste na formação de microbolhas que irão expandir gradualmente até entrarem em colapso, causando pequenas implosões que produzem uma agitação irregular do irrigante. Ambos os fenômenos são considerados a razão principal pela qual os detritos são removidos das paredes dos canais radiculares além do aumento da temperatura do irrigante causada pelas vibrações (Haapasalo, 2012).

Na revisão da literatura existente sobre a agitação sónica e ultra-sónica, pode-se concluir que estas têm o potencial de otimizar a desinfecção endodôntica, embora existam alguns casos em que isto não aconteça. A controvérsia nestes resultados pode ser explicada pelo tipo de modelos usado, a maneira como a agitação foi realizada e a avaliação dos resultados (Halford, 2012).

No que toca a modelos usados estes variaram desde blocos de resina, dentes extraídos e discos de hidroxiapatite revestidos por colagénio. Por sua vez, as soluções irrigantes também variaram entre soluções salinas estéreis, clorexidina e hipoclorito de sódio. (Siqueira *et al.*, 1997; Townsend, 2009; Shen *et al.*, 2010; Halford, 2012).

O modo de crescimento dos biofilmes também é um factor importante devido à composição de espécies poder variar como também o tempo de incubação (Siqueira *et al.*, 1997; Shen *et al.*, 2010; Halford, 2012).

O modo como a agitação foi realizada também irá influenciar os resultados dos estudos podendo a sua duração variar de 15 segundos a 5 minutos e as distâncias do ápice de 2mm até à totalidade do comprimento de trabalho. A própria avaliação dos resultados poderá também ser um factor responsável pela disparidade de dados podendo esta avaliação variar entre a observação visual da turvação até a uma análise de unidades formadoras de colónias. (Cameron, 1982; Pasqualini *et al.*, 2010; Halford, 2012).

Apesar de existir esta disparidade na revisão da Literatura, várias conclusões podem ser feitas no que toca ao mecanismo de acção destes aparelhos. O sistema de canais radiculares apresenta diversos desafios, que irão limitar os benefícios da agitação sónica e ultra-sónica. Por exemplo, a agitação ultra-sónica poderá ter a sua eficácia reduzida quando a lima entra em contacto com as paredes do canal, principalmente se este contacto for num antinodo. Já a agitação sónica é menos influenciada pelas complicações anatómicas de um canal radicular (Ahmad, 1992; Halford, 2012).

Embora a Literatura indique que a agitação sónica e ultra-sónica são benéficas para a desinfeção dos canais radiculares, as disparidades de resultados fazem com que estes benefícios não sejam conclusivos, o que leva a que seja necessário a criação de um modelo de estudo que possa abordar todas as diferentes variáveis que poderão influenciar os resultados no que toca à erradicação dos microorganismos no sistema de canais radiculares (Halford, 2012).

3.4. Terapia fotodinâmica antimicrobiana

A terapia fotodinâmica antimicrobiana consiste na inativação celular induzida pela luz. Esta inativação passa por 2 passos, sendo o primeiro a introdução de um fotossensibilizador não tóxico no tecido alvo, e, o segundo passo, a irradiação deste tecido com uma fonte de luz a um comprimento de onda específico. Após a fotoativação na presença de oxigénio, ocorrem uma série de reacções, nomeadamente a produção de radicais livres e de moléculas de oxigénio “singlete” (moléculas de oxigénio eletricamente excitadas) que irão levar à erradicação bacteriana por lise celular (Kishen, 2012; Chrepa *et al.*, 2014).

Este processo pode ser explicado pelo fotossensibilizador ao ser ativado pela luz, passando de um estado de baixa energia para um estado de alta energia denominado de estado “triplete”. O fotossensibilizador, ao entrar neste estado, passa a ser extremamente reativo e poderá reagir de uma ou ambas as formas explicadas seguidamente (Kishen, 2012; Chrepa *et al.*, 2014):

- Reação tipo I – O fotossensibilizador no estado de alta energia poderá reagir com outras moléculas para além do oxigénio, por transferência de eletrões ou hidrogénio, levando a que surjam iões radicais (uma espécie de radical livre), que, ao reagirem com o oxigénio disponível, levará ao aparecimento de espécies reativas desta molécula como o peróxido de hidrogénio, o anião radical superóxido e o radical hidroxilo sendo estas espécies citotóxicas.
- Reação tipo II – O fotossensibilizador no estado de alta energia reage com o oxigénio, transferindo a energia de excitação para produzir as moléculas de oxigénio singlete.

Ambas as reações têm um efeito bactericida podendo ocorrer por dano na membrana celular ou por dano no DNA celular e são influenciadas pelo tipo e dose do fotossensibilizador, pelo tempo de incubação, pelo comprimento de onda da luz utilizada e pela disponibilidade de oxigénio. Devido à interação do oxigénio reativo não ser específica, qualquer macromolécula dentro das células onde foi aplicado o fotossensibilizador poderá ser um alvo. Isto leva a uma dificuldade acrescida das bactérias poderem desenvolver resistências a esta terapia. Contudo, existe uma diferença significativa na suscetibilidade de bactérias Gram – e Gram +, explicada pela fisiologia da membrana plasmática, sendo as bactérias Gram – mais resistentes a este tipo de terapia (Alfenas *et al.*, 2011; Haapasalo, 2012).

As fontes de radiação podem ser coerentes (lasers) ou não coerentes (lâmpadas) e a escolha, entre estas, deverá ser feita dependendo da localização, da dose de luz necessária e da escolha do fotossensibilizador. A fonte de luz poderá ser distribuída por meio de fibras óticas, que irão otimizar o acesso da luz ao canal radicular com perdas de energia mínimas (Alfenas *et al.*, 2011; Kishen, 2012).

Já a escolha do fotossensibilizador é baseada na capacidade de absorção da luz no comprimento de onda em questão, sendo o grupo das fenotiazinas, como por exemplo o azul de metileno e o azul de toluidina, o mais usado para aplicações clínicas (Kishen, 2012).

Visto que esta terapia é baseada numa reação fotoquímica, existe a vantagem de não provocar efeitos secundários térmicos ao contrário de várias técnicas laser utilizadas. Esta vantagem permite a erradicação de bactérias, fungos e vírus sem causar dano nos tecidos periapicais, devido ao sobreaquecimento do canal radicular. No que toca a limitações, o tipo de espécies bacterianas e o seu modo de crescimento poderá influenciar a eficácia antimicrobiana desta terapia, como também a dentina, restos de tecido pulpar e lipopolissacarídeos bacterianos (Chrepa *et al.*, 2014).

Relativamente à eficácia antimicrobiana, esta terapia feita em biofilmes endodônticos tem fracassado, por não conseguir eliminar completamente os microorganismos, o que leva a que seja combinada com as estratégias antimicrobianas existentes nomeadamente a preparação quimicomecânica do sistema de canais radiculares de modo a otimizar a erradicação bacteriana (Haapasalo, 2012).

Tentativas de melhorar o efeito bactericida nesta terapia têm sido feitas, nomeadamente num estudo feito por George & Kishen em 2008 consistindo em dissolver o fotossensibilizador azul-de-metileno em várias formulações (água, 70% polietilenoglicol, 70% glicerol e uma mistura de glicerol-etanol-água), com o objetivo de melhorar a penetração do azul-de-metileno nos túbulos dentinários e aumentar a produção de oxigénio singlete. Estes autores estudaram também o efeito da incorporação de um agente oxidante e um transportador de oxigénio com o fotossensibilizador numa emulsão, a qual aumentou significativamente a capacidade de foto-oxidação, levando a uma melhoria na rutura das estruturas dos biofilmes (George, 2008 a; George, 2008 b).

Deste modo, a terapia fotodinâmica antimicrobiana poderá ter um papel importante como uma técnica adjuvante no tratamento endodôntico. Não obstante, estudos nesta

temática deverão focar-se em aumentar o efeito desta terapia, dando destaque ao aumento da distribuição do fotossensibilizador nos túbulos dentinários e na hiperoxigenação do sistema de canais radiculares (Haapasalo, 2012).

3.5. Medicação intracanal

A medicação intracanal, tal como os irrigantes, faz parte dos agentes antimicrobianos tópicos usados em endodontia. Porém, é aplicada entre consultas, enquanto os irrigantes são usados durante e após a preparação químico-mecânica. O objetivo desta medicação passa por complementar a instrumentação mecânica e a irrigação química quando estas provam ser insuficientes na desinfecção bacteriana (Waltimo, 2009).

Devido ao espaço de tempo existente entre as consultas, um fármaco que é usado como medicação intracanal deve ter a capacidade de permanecer fisicamente intacto durante semanas ou meses, resistindo aos componentes orgânicos e inorgânicos presentes no interior do canal radicular, como por exemplo, o tecido necrótico ou o fluído tecidual. Além desta resistência, o medicamento intracanal deve possuir os requisitos normais de um agente antimicrobiano tópico usado em endodontia, como a ação nos biofilmes, capacidade de dissolução de tecidos, ação na “*smear layer*” e uma baixa toxicidade e potencial alergénico (Waltimo, 2009; Haapasalo, 2012).

É importante referir que a actividade antimicrobiana de vários medicamentos intracanales é reduzida devido à presença de tecido necrótico no interior do canal, como também de colagénio e proteínas séricas. Contudo este efeito inibitório dos conteúdos intracanales é reduzido com o tempo e resta saber se a presença dos medicamentos intracanales por um período igual ou superior a 7 dias (tempo entre consultas) é suficiente para ultrapassar o efeito inibidor destes conteúdos de modo a apresentar uma desinfecção eficaz. A presença de dentina, principalmente dentina proveniente do canal radicular também poderá influenciar o ph do hidróxido de cálcio, reduzindo-o de modo a diminuir o efeito antimicrobiano (Machado De Oliveira *et al.*, 2010; Agrafioti, 2013).

Dos medicamentos intracanales, o mais frequentemente usado, é a pasta de hidróxido de cálcio, devido a ser bastante alcalino, e, ao ser dissociado em íons cálcio e hidróxido numa solução aquosa, ter um potencial antimicrobiano por danificar a membrana citoplasmática, danificar o DNA bacteriano e desnaturar proteínas tendo também a capacidade de dissolução de tecidos. Este composto, por ter uma solubilidade fraca, poderá ser usado durante longos períodos de tempo, sendo a função fundamental a de impedir o crescimento bacteriano (Delgado *et al.*, 2010).

Embora o hidróxido de cálcio seja o medicamento intracanal mais comum, o seu uso desperta ainda, alguma controvérsia. Ainda que este medicamento tenha uma boa atividade antimicrobiana, esta é dependente do contacto direto com as bactérias. Isto leva a que o hidróxido de cálcio, devido à sua solubilidade fraca, a qual é essencial para a resistência ao longo do tempo, tenha dificuldade em eliminar as bactérias presentes em fendas do canal ou no interior dos túbulos dentinários por uma falta de acesso a estas. No que toca à eficácia deste medicamento, alguns estudos como o de Distel *et al.*, demonstraram que biofilmes de *E.faecalis* poderiam continuar a ser formados apesar da presença de hidróxido de cálcio no canal, podendo isto ser explicado pelo facto de estas bactérias terem uma alta resistência a ambientes alcalinos. Num estudo feito por Chavez *et al.*, foi também demonstrado que as bactérias organizadas em biofilmes possuem uma resistência aumentada a um ambiente alcalino comparadas com as bactérias no estado planctónico. Porém, alguns estudos relatam que este medicamento é eficaz, removendo as bactérias presentes nos canais radiculares após uma semana ou um período de tempo maior entre consultas. (Shuping *et al.*, 2000; Kvist *et al.*, 2004; Chávez de Paz *et al.*, 2007 b; Haapasalo, 2012).

Por este motivo, outros medicamentos têm sido sugeridos como alternativa, dando destaque à clorexidina, pelo seu largo espectro antimicrobiano e elevado período de tempo no qual esta substância é ativa no interior do canal. A eficácia deste medicamento pode ser comparada à do hidróxido de cálcio não havendo diferenças significativas no que toca à eficácia antimicrobiana (Tervit *et al.*, 2009; Delgado *et al.*, 2010).

Devido a nenhum medicamento intracanal ser eficaz contra todos os microorganismos presentes na infecção endodôntica, e devido ao hidróxido de cálcio ser o medicamento mais usado, leva a que este seja combinado com outras substâncias como a clorexidina ou o iodeto de potássio, para que a eficácia bacteriana seja suplementada por efeitos aditivos ou sinérgicos, sem que a alcalinidade do hidróxido de cálcio seja afetada (Haapasalo, 2012).

3.6. Desinfecção assistida por laser

A aplicação dos lasers em endodontia tem sido um tema extensivamente estudado, nomeadamente nos lasers Er:YAG e Er,Cr:YSGG no que toca à desinfecção do sistema de canais radiculares. O efeito bactericida dos lasers é dependente das características do comprimento de onda da radiação, e das características do tecido irradiado como as propriedades de absorção, reflexão, transmissão e dispersão de luz. O laser irá então provocar uma reacção térmica o que produz uma alteração da parede celular, levando à mudança de gradientes de Osmose e à morte celular, sendo as bactérias Gram – mais resistentes a este tipo de efeitos devido características distintas na parede celular (Kimura *et al.*, 2011, Kishen, 2012).

É importante ter em conta as limitações deste método, como o modo de emissão do laser, podendo ser por via de fibras ópticas o que fará com que a radiação seja direccionada ao longo do canal radicular, negligenciando assim os canais laterais. A radiação deste modo poderá ser transmitida directamente no forâmen apical levando a uma lesão térmica dos tecidos periapicais em redor do canal, podendo as consequências desta lesão serem agravadas se este estiver em proximidade do forâmen mentoniano ou do nervo mandibular. Contudo esta limitação pode ser colmatada com o uso de um sistema testado em lasers Er:YAG, composto por um tubo que permite a emissão lateral de radiação em vez de um único feixe emitido pela extremidade das fibras ópticas, estando a extremidade neste tubo fechada (Kishen, 2012).

No que toca à eficácia antimicrobiana deste tipo de procedimento, num estudo efectuado por Noiri *et al.*, em discos de hidroxiapatite cobertos por biofilmes

monomicrobianos, foi demonstrado que o laser Er:YAG é capaz de reduzir significativamente o número de células viáveis existentes em grande parte dos biofilmes, embora a eliminação e a destruição completa da arquitectura do biofilme não tenha sido possível (Noiri *et al.*, 2008).

Já num estudo feito por Wang, em canais estreitos com biofilmes de *E.faecalis*, foi testada a eficácia antimicrobiana dos lasers Er:YAG e Er,Cr:YSGG em comparação com a irrigação feita por NaOCl. Os efeitos antimicrobianos provaram ser inferiores que este irrigante. Contudo a emissão destes lasers foi feita por fibras ópticas de extremidade aberta, impossibilitando a irradiação de canais laterais, o que irá reduzir o efeito antimicrobiano (Wang, 2007).

Já num estudo por Dewsnup *et al.*, a eficácia do laser Er,Cr:YSGG foi testada em canais estreitos e curvos com biofilmes de *E.faecalis*, comparativamente à eficácia de uma solução a 6,15% de NaOCl. Foi demonstrado que não existia uma diferença significativa entre os métodos de desinfeção usados, porém alguns canais curvos não foram completamente desinfectados com o método laser (Dewsnup *et al.*, 2010).

A literatura actualmente existente não permite tirar ainda conclusões relativamente ao uso de lasers como um meio suplementar de desinfeção embora isto não indique que estes não devam ser usados no tratamento endodôntico, mas sim que devem ser feitos mais estudos nesta área de modo a determinar ao certo se o seu uso será benéfico para otimizar a desinfeção no sistema de canais radiculares (Kishen, 2012).

3.7. Nanopartículas antibacterianas

As nanopartículas, como o nome indica são partículas microscópicas com dimensões compreendidas entre 1-100 nm e com propriedades diferentes de partículas com maiores dimensões nomeadamente no que toca à actividade biológica, área de superfície e reactividade química, levando a uma maior interacção com as células bacterianas que por sua vez aumenta a actividade antimicrobiana. A eficácia das nanopartículas em

endodontia irá depender do tipo usado e do método de distribuição destas partículas no sistema de canais radiculares (Allaker, 2014; Mohammadi, 2014).

A interacção electrostática entre as nanopartículas carregadas positivamente e as células bacterianas carregadas negativamente aliada à acumulação de um grande número de partículas na membrana celular leva a um aumento da permeabilidade e perda da função desta membrana. Esta interacção electrostática ocorre também na dentina, devido a esta ser carregada negativamente, e embora esta ligação seja fraca e facilmente interrompida, é suficiente para impedir a recolonização bacteriana e a formação de biofilmes (Kishen, 2012).

Os metais têm sido usados durante séculos como agentes antimicrobianos, dando destaque à prata, cobre e zinco que são actualmente usados em nanopartículas. Os iões de cobre por exemplo induzem stress oxidativo afectando o potencial redutor das células o que irá levar a danos na membrana celular e no DNA. Os iões de zinco por sua vez a partir de um certo limiar de concentração inibem as enzimas bacterianas o que irá causar uma interrupção na actividade metabólica celular. Os iões de prata inactivam proteínas e impedem a replicação do DNA (Kishen, 2012; Allaker, 2013).

Nanopartículas baseadas em sílica têm sido alvo de interesse, como por exemplo o vidro bioactivo (composto por sílica, óxido de sódio, óxido de cálcio e pentóxido de fósforo) que possui várias propriedades antimicrobianas. Os mecanismos antimicrobianos deste composto passam por um elevado pH, um aumento de efeitos osmóticos e a precipitação de fosfato de cálcio. Contudo num estudo feito por Zehnder *et al.* foi demonstrado que a capacidade de desinfecção do vidro bioactivo era inferior ao hidróxido de cálcio levando a que sejam necessários mais estudos de modo a poder usar este composto em endodontia (Zehnder *et al.*, 2006; Kishen, 2012).

A quitosina é um biopolímero natural não tóxico derivado da quitina usado também na forma de nanopartículas. Estas nanopartículas apresentam uma excelente actividade antibacteriana e antifúngica, embora o mecanismo de actuação exacto seja ainda desconhecido, contudo a interacção electrostática irá fazer com que estas moléculas

umentem a permeabilidade da membrana celular e levar à perda de proteínas e outros componentes celulares. Num estudo feito por Shrestha *et al.* foi investigada a eficácia antimicrobiana de nanopartículas de quitosina e de óxido de zinco, sendo ambas capazes de causar rupturas em biofilmes de *E.faecalis* como também de manter as suas propriedades antimicrobianas durante 90 dias (Shrestha, 2010; Kishen 2012).

A adição das nanopartículas de quitosina com fotossensibilizadores leva a uma melhoria das propriedades antibacterianas, devido às nanopartículas fornecerem uma área de superfície para o fotossensibilizador se ligar tornando-o mais reactivo, enquanto a produção de oxigénio no estado singlete leva a uma suplementação da afinidade às células bacterianas, sendo assim a actividade antimicrobiana dos fotossensibilizadores e da quitosina sinérgica. Num estudo recente realizado por Shrestha foi demonstrado que esta combinação, com o fotossensibilizador sendo um corante de Rosa Bengala após a fotoactivação tem o potencial de eliminar completamente as bactérias de *E.faecalis* num estado planctónico após 24 horas, não sendo afectadas pela presença de restos de tecidos e constituintes de dentina no sistema de canais radiculares (Shrestha, 2014).

Em outro estudo por Shrestha as nanopartículas de quitosina combinadas com o fotossensibilizador Rosa Bengala demonstraram ser capazes de causar uma redução da espessura e células viáveis de um biofilme polimicrobiano como também a ruptura da arquitectura deste. As nanopartículas aliadas à fotoactivação apresentam-se então como um possível agente antimicrobiano para a desinfeção do sistema de canais radiculares (Shrestha, In Press).

III. Conclusão

Conclui-se primeiramente que o objetivo de um tratamento endodôntico passa por prevenir o aparecimento da periodontite apical, ou em casos onde esta esteja presente, fornecer condições apropriadas para a regeneração dos tecidos afetados. Para que tal aconteça é necessário proceder à desinfeção do sistema de canais radiculares, que passa pela erradicação dos microorganismos presentes. Estes microorganismos encontram-se organizados numa comunidade estruturada de células bacterianas,

envolvidos numa matriz de substâncias poliméricas e aderidos a uma superfície sólida. A esta organização dá-se o nome de biofilme e este constitui um modo de protecção bacteriana num ambiente hostil, e também de protecção contra agentes antimicrobianos devido a vários mecanismos característicos a este modo de organização. O método principal de desinfeção no sistema de canais radiculares passa pela instrumentação mecânica e a irrigação química. O objetivo da instrumentação mecânica consiste em dar uma geometria adequada aos canais, promovendo o acesso das soluções irrigantes que irão complementar o efeito antimicrobiano e tornar possível a obturação com um material de alta qualidade. Várias limitações irão dificultar esta desinfeção, como a complexidade anatómica dos canais, a presença de um ambiente químico complexo e a maturidade do biofilme presente. De modo a tentar ultrapassar estas limitações várias estratégias avançadas de desinfeção têm sido propostas como o uso de nanopartículas, a terapia fotodinâmica antimicrobiana, ou o uso de vários lasers. Embora estas estratégias antimicrobianas pareçam promissoras e com bons resultados *in vitro*, elas carecem de estudos *in vivo* para determinar a sua eficácia antimicrobiana. Actualmente o método de desinfeção mais eficaz parece ser a instrumentação químico-mecânica, dando ênfase à irrigação com o NaOCl, podendo ser complementada com medicação intracanal entre consultas. Contudo, estudos deverão ser feitos, de modo a ter um melhor entendimento sobre a organização dos biofilmes, os constituintes bacterianos e o modo como estes interagem, para assim serem desenvolvidos métodos de tratamento que possam ultrapassar as resistências oferecidas pela organização em biofilmes e que impeçam a recolonização bacteriana.

IV. Bibliografia

Agrafioti, A., Tzimpoulas, N. e Kontakiotis, E. (2013). Influence of Dentin from the Root Canal Walls and the Pulp Chamber Floor on the pH of Intracanal Medicaments. *Journal of Endodontics*, 39(5), pp. 701-703.

Ahmad, M., Roy, R. e Kamarudin, A. (1992). Observations of acoustic streaming fields around an oscillating ultrasonic file. *Endodontic Dental Traumatology*. 8(5), pp.189-194.

Alfenas, C. *et al.* (2011). Photodynamic therapy in the reduction of microorganisms in the root canal system. *Revista brasileira de odontologia*, 68(1), pp. 68- 71.

Allaker, R. e Memarzadeh, K. (2014). Nanoparticles and the control of oral infections. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 43, pp. 95-104.

Athanassiadis, B., Abbott, P. e Walsh, L. (2007). O uso de hidróxido de cálcio, antibióticos e biocidas como medicamentos antimicrobianos na endodontia. *Australian Dental Journal*, 52, pp. 64- 82.

Cameron, J. (1982). The use of ultrasound in the cleaning of root canals: A clinical report. *Journal of Endodontics*. 8(10) pp. 472-474.

Chávez de Paz, L. (2007) a. Redefinindo a infecção persistente em canais radiculares: Possível papel das comunidades de biofilme. *Journal of Endodontics*, 33(6), pp. 652-662.

Chávez de Paz, L. *et al.* (2007) b. Response to alkaline stress by root canal bacteria in biofilms. *International Endodontic Journal*, 40, pp.344-355.

Chrepa, V. *et al.*(2014). The Effect of Photodynamic Therapy in Root Canal Disinfection: A Systematic Review. *Journal of Endodontics*. 40(7), pp. 891- 898.

Clegg, M. *et al.* (2006). The Effect of Exposure to Irrigant Solutions on Apical Dentin Biofilms In Vitro. *Journal of Endodontics*, 32(5), pp. 434- 437

Dahlén, G. (2009). Culture-based analysis of endodontic infections In: Fouad, A. Endodontic microbiology. 1 ed. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell, pp. 40- 67.

Dalton, B. *et al.* (1998). Bacterial Reduction with Nickel-Titanium Rotary Instrumentation. *Journal of Endodontics*, 24(11), pp. 763- 767.

Delgado, R. *et al.* (2010). Antimicrobial effects of calcium hydroxide and chlorhexidine on *Enterococcus faecalis*. *Journal of Endodontics*, 36(8), pp. 1389- 1393.

Dewsnup, N. *et al.* (2010). Comparison of Bacterial Reduction in Straight and Curved Canals Using Erbium, Chromium:Yttrium-Scandium-Gallium-Garnet Laser Treatment versus a Traditional Irrigation Technique With Sodium Hypochlorite. *Journal of Endodontics*, 36(4), pp. 725-728.

Dufour, D., Leung, V. e Lévesque, C. (2012). Bacterial biofilm: structure, function, and antimicrobial resistance. *Endodontic Topics*, 22, pp. 2- 16.

Dunavant, T. *et al.* (2006). Avaliação comparativa dos irrigantes contra *Enterococcus faecalis* biofilmes. *Journal of Endodontics*, 32(6), pp. 527- 531.

Figdor, D. e Sundqvist, G. (2007). A big role for the very small- understanding the endodontic microbial flora. *Australian Dental Journal Supplement*, 52, pp. s38- s51.

Flemming, H. e Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8, pp. 623- 633.

George, S. e Kishen, A. (2008) a. Influence of photosensitizer solvent on the mechanisms of photoactivated killing of *Enterococcus faecalis*. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, 84(3), pp. 734- 740.

George, S. e Kishen, A. (2008) b. Augmenting the antibiofilm efficacy of advanced noninvasive light activated disinfection with emulsified oxidizer and oxygen carrier. *Journal of Endodontics*, 34(9), pp. 1119- 1123.

Giampiero, R. et al. (2012). Antagonistic Interactions between Sodium Hypochlorite, Chlorhexidine, EDTA, and Citric Acid. *Journal of Endodontics*, 38(4), pp. 426- 431.

Giardino, L. et al. (2007). Comparative Evaluation of Antimicrobial Efficacy of Sodium Hypochlorite, MTAD, and Tetraclean Against *Enterococcus faecalis* Biofilm. *Journal of Endodontics*, 33(7), pp. 852- 855.

Grenier, D. e Mayrand, D. (1986). Nutritional relationships between oral bacteria. *Infection and Immunity*, 53(3), pp. 616- 620.

Haapasalo, M. e Shen, Y. (2012). Current therapeutic options for endodontic biofilms. *Endodontic Topics*, 22(1), pp. 79- 98.

Hall – Stoodley, L. e Stoodley, P. Evolving concepts in biofilm infections. *Cellular Microbiology*, 11(7), pp. 1034- 1043.

Hof, R. et al. (2010). The self-adjusting file (SAF). Part 2: mechanical analysis. *Journal of Endodontics*, 36(a), pp. 691–696.

Hong, B. et al. (2013). Microbial Analysis in Primary and Persistent Endodontic Infections by Using Pyrosequencing. *Journal of Endodontics*, 39(9), pp. 1136- 1140.

Høiby, N. *et al.* (2010). Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 35, pp. 322- 332.

Kalia, V. (2012). Quorum sensing inhibitors: An overview. *Biotechnology Advances*, 31, pp. 224- 245.

Kim, H. *et al.* (2013). Efficacy of Flowable Gel-type EDTA at Removing the Smear Layer and Inorganic Debris under Manual Dynamic Activation. *Journal of Endodontics*, 39(7), pp. 910- 914.

Kimura, Y. *et al.* (2011). Histological examination of experimentally infected root canals after preparation by Er:YAG laser irradiation. *Lasers in Medical Science*, 26, pp. 749-754.

Kishen, A. (2012). Advanced therapeutic options for endodontic biofilms. *Endodontic Topics*, 22, pp. 99– 123.

Kvist, T. *et al.* (2004). Microbiological Evaluation of One- and Two-Visit Endodontic Treatment of Teeth with Apical Periodontitis: A Randomized, Clinical Trial. *Journal of Endodontics*, 30(8), pp. 572- 576.

Lazar, V. (2011). Quorum sensing in biofilms- how to destroy the bacterial citadels or their cohesion/power? *Journal Anaerobe*, 17(6), pp. 280- 285.

Lin, J., Shen, Y. e Haapasalo, M. (2013). A Comparative Study of Biofilm Removal with Hand, Rotary Nickel-Titanium, and Self-Adjusting File Instrumentation Using a Novel *In Vitro* Biofilm Model. *Journal of Endodontics*, 39(5), pp. 658- 663.

Machado de Oliveira, J. *et al.* (2010). Influence of Serum and Necrotic Soft Tissue on the Antimicrobial Effects of Intracanal Medicaments. *Brazilian Dental Journal*, 21(4), pp. 295- 300.

Mancini, M. *et al.* (2013). Smear layer removal and canal cleanliness using different irrigation systems (EndoActivator, EndoVac, and passive ultrasonic irrigation): field emission scanning electron microscopic evaluation in an *in vitro* study. *Journal of Endodontics*, 39(11), pp. 1456- 1460.

Mareending, M. *et al.* (2007). Impact of irrigant sequence on mechanical properties of human root dentin. *Journal of Endodontics*, 33(11), pp. 1325- 1328.

Metzger, Z., Basrani, B. e Goodis, H. (2011). Instruments, Materials, and Devices In: Hargreaves & Cohen. Cohen's Pathways of the Pulp.10 ed.St Louis : Mosby/Elsevier, pp. 212-264.

Metzger, Z. *et al.* (2010). The Self-adjusting File (SAF). Part 1: Respecting the Root Canal Anatomy-A New Concept of Endodontic Files and Its Implementation. *Journal of Endodontics*, 36(4), pp. 679- 690.

Mohammadi, Z., Soltani, M. e Shalavi, S. (2014). An Update on the Management of Endodontic Biofilms Using Root Canal Irrigants and Medicaments. *Iranian Endodontic Journal*, 9(2), pp. 89-97.

Nair, P. *et al.* (2005). Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after "one-visit" endodontic treatment. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 99(2), pp. 231- 252.

Nair, R. (1987). Light and electron microscopic studies of root canal flora and periapical lesions. *Journal of Endodontics*, 13(1), pp. 29- 39.

Noiri, Y. *et al.* (2008). Effects of Er:YAG laser irradiation on biofilm-forming bacteria associated with endodontic pathogens *in vitro*. *Journal of Endodontics*, 34(7), pp. 826- 829.

Pappen, F. *et al.* (2010). *In vitro* antibacterial action of Tetraclean, MTAD and five experimental irrigation solutions. *International endodontic journal*, 43(6), pp. 528- 535.

Paqué, F. *et al.* (2010). Preparation of Oval-shaped Root Canals in Mandibular Molars Using Nickel-Titanium Rotary Instruments: A Micro-computed Tomography Study. *Journal of Endodontics*, 36(4), pp. 703- 707.

Parsek, M. e Singh P. (2003). Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Annual Review of Microbiology*, 57, pp. 677- 701.

Pasqualini, D. *et al.* (2010). Comparative evaluation of the antimicrobial efficacy of a 5% sodium hypochlorite subsonic-activated solution. *Journal of Endodontics*, 36(8), pp. 1358-1360.

Peters, O. *et al.* (2010). Root Canal Preparation with a Novel Nickel-Titanium Instrument Evaluated with Micro-computed Tomography: Canal Surface Preparation over Time. *Journal of Endodontics*, 36(6), pp. 1068- 1072.

Psimma, Z. *et al.* (2013). Effect of needle insertion depth and root canal curvature on irrigant extrusion ex vivo. *Journal of Endodontics*, 39(4), pp. 521- 524.

Retamozo, B. *et al.* (2010). Minimum Contact Time and Concentration of Sodium Hypochlorite Required to Eliminate *Enterococcus faecalis*. *Journal of Endodontics*, 36(3), pp. 520- 523.

Ricucci, D. e Siqueira, J. (2010). Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. *Journal of Endodontics*, 36(8), pp.1277- 1288.

Roças, I. e Siqueira, J. (2011). Comparison of the in vivo antimicrobial effectiveness of sodium hypochlorite and chlorhexidine used as root canal irrigants: a molecular microbiology study. *Journal of Endodontics*, 37(2), pp. 143- 150.

Sedgley, C. *et al.* (2005). Influence of irrigant needle depth in removing bioluminescent bacteria inoculated into instrumented root canals using real-time imaging in vitro. *International Endodontic Journal*, 38, pp. 97- 104.

Shäfer, E. (2007). Irrigation of the root canal. *Endo*, 1(1), pp. 11- 27.

Shen, Y. *et al.* (2010). The synergistic antimicrobial effect by mechanical agitation and two chlorhexidine preparations on biofilm bacteria. *Journal of Endodontics*, 36(1), pp. 100- 104.

Shen, Y., Stojicic, S. e Haapasalo, M. (2011). Antimicrobial efficacy of chlorhexidine against bacteria in biofilms at different stages of development. *Journal of Endodontics*, 37(5), pp. 657- 661.

Shrestha, A. *et al.* (2010). Nanoparticles for antibiofilm treatment and effect of aging on its antibacterial activity. *Journal of Endodontics*, 36(6), pp. 1030-1035.

Shrestha, A. e Kishen, A. (2014). Antibacterial Efficacy of Photosensitizer Functionalized Biopolymeric Nanoparticles in the Presence of Tissue Inhibitors in Root Canal. *Journal of Endodontics*, 40(4), pp. 566-570.

Shrestha, A. e Kishen, A. (In Press), Antibiofilm Efficacy of Photosensitizer-functionalized Bioactive Nanoparticles on Multispecies Biofilm, *Journal of Endodontics*.

Shuping, G. *et al.* (2000). Reduction of intracanal bacteria using nickel-titanium rotary instrumentation and various medications. *Journal of Endodontics*, 26(12), pp. 751- 755.

Simone, S. *et al.* (2013). Molecular Microbiological Evaluation of Passive Ultrasonic Activation as a Supplementary Disinfecting Step: A Clinical Study. *Journal of Endodontics*, 39(2), pp. 190- 194.

Siqueira, J. *et al.* (1997). Histological evaluation of the effectiveness of five instrumentation techniques for cleaning the apical third of root canals. *Journal of Endodontics*, 23(8)pp. 499-502.

Siqueira, J. *et al.* (2002). Efficacy of instrumentation techniques and irrigation regimens in reducing the bacterial population within root canals. *Journal of Endodontics*, 28(3), pp. 181- 184.

Siqueira, J. e Roças, I. (2008). Implicações clínicas e microbiologia de persistência bacteriana após procedimentos de tratamento. *Journal of Endodontics*, 34(11), pp. 1291-1301

Siqueira, J e Roças, I. (2009) a. Distinctive features of the microbiota associated with different forms of apical periodontitis. *Journal of Oral Microbiology*, 1, pp. 1-29.

Siqueira, J e Roças, I. (2009) b. Molecular Analysis of Endodontic Infections In: Fouad, A. Endodontic microbiology. 1 ed. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell, pp. 68- 106.

Siqueira, J. *et al.* (2010). Ability of chemomechanical preparation with either rotary instruments or self-adjusting file to disinfect oval-shaped root canals. *Journal of Endodontics*, 36(11), pp. 1860- 1865.

Siqueira, J. e Roças, I. (2011). Microbiology and treatment of endodontic infections In: Hargreaves & Cohen. Cohen's Pathways of the Pulp.10 ed.St Louis : Mosby/Elsevier, pp. 559-600.

Siqueira, J. Roças, I. e Ricucci, D. (2012). Biofilms in endodontic infection. *Endodontic Topics*, 22, pp. 33- 49.

Sirtes, G. *et al.* (2005). The Effects of Temperature on Sodium Hypochlorite Short-Term Stability, Pulp Dissolution Capacity, and Antimicrobial Efficacy. *Journal of Endodontics*, 31(9), pp. 669- 671.

Soto, S. (2013). Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm. *Virulence* , 4(3), pp. 223- 229.

Svensater, G. e Bergenholtz, G. (2004). Biofilms in endodontic infections . *Endodontic Topics*, 9, pp. 27- 36.

Teles, A. *et al.* (2013). Microorganisms: the reason to perform Endodontics In: Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education.Editors: A. Méndez-Vilas, pp. 1778- 1786.

Tennert, C. *et al.* (2014). New Bacterial Composition in Primary and Persistent/ Secondary Endodontic Infections with Respect to Clinical and Radiographic Findings. *Journal of Endodontics*, 40(5), pp. 670– 677.

Tervit, C. *et al.* (2009). Proportion of healed teeth with apical periodontitis medicated with two percent chlorhexidine gluconate liquid: a case-series study. *Journal of Endodontics*, 35(9), pp. 1182-1185.

Tianfeng, D. *et al.* (2014). Effect of long-term exposure to endodontic disinfecting solutions on young and old *Enterococcus faecalis* biofilms in dentin canals. *Journal of Endodontics*, 40(4), pp. 509- 514.

Townsend, C e Maki, J. (2009). An in vitro comparison of new irrigation and agitation techniques to ultrasonic agitation in removing bacteria from a simulated root canal. *Journal of Endodontics*, 35(7), pp. 1040-1043.

Van der Sluis, L. *et al.* (2007). Passive ultrasonic irrigation of the root canal: a review of the literature. *International endodontic journal*, 40(6), pp. 415- 426.

Waltimo, T. e Zehnder, M. (2009). Topical Antimicrobials in Endodontic Therapy In: Fouad, A. Endodontic microbiology. 1 ed. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell, pp. 68- 106.

Wang, QQ., Zhang, CF. e Yin, XZ. (2007). Evaluation of the bactericidal effect of Er,Cr:YSGG, and Nd:YAG lasers in experimentally infected root canals. *Journal of Endodontics*, 33(7), pp. 830-832.

Wang, Z., Shen, Y. e Haapasalo, M. (2012). Effectiveness of Endodontic Disinfecting Solutions against Young and Old *Enterococcus faecalis* Biofilms in Dentin Canals. *Journal of Endodontics*, 38(10), pp. 1376- 1379.

Wang, Z., Shen, Y. e Haapasalo, M. (2013). Effect of smear layer against disinfection protocols on *Enterococcus faecalis*-infected dentin. *Journal of Endodontics*, 39(11), pp. 1395- 1400.

Wong, D. e Cheung, G. (2014). Extension of Bactericidal Effect of Sodium Hypochlorite into Dentinal Tubules. *Journal of Endodontics*, 40(6), pp. 825- 829.

Wu, M. *et al.* (2000). Prevalence and extent of long oval canals in the apical third. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 89(6), pp. 739- 743.

Wu, D. *et al.* (2014). Evaluation of the Antibacterial Efficacy of Silver Nanoparticles against *Enterococcus faecalis* Biofilm. *Journal of Endodontics*, 40(2), pp. 285- 290.

Zehnder, M. (2006). Root canal irrigants. *Journal of Endodontics*, 32(5), pp. 389- 398.

Zehnder, M. *et al.* (2006). A comparative study on the disinfection potentials of bioactive glass S53P4 and calcium hydroxide in contra-lateral human premolars *ex vivo*. *International Endodontics Journal*, 39(12), pp. 952-958.