

Joana Moura da Silva

***Enterococcus sp.*: considerações clínicas e microbiológicas em
endodontia**

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2013

Joana Moura da Silva

***Enterococcus sp.*: considerações clínicas e microbiológicas em
endodontia**

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2013

Joana Moura da Silva

***Enterococcus sp.*: considerações clínicas e microbiológicas em
endodontia**

Declaro que este trabalho foi por mim realizado na íntegra e que todas as fontes empregadas foram devidamente referenciadas na sua totalidade.

(Joana Moura da Silva)

Trabalho apresentado à
Universidade Fernando Pessoa como parte
dos requisitos para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Resumo

O dente é uma estrutura muito complexa e um alvo bacteriano que quando não é tratado corretamente pode conduzir a infecções endodônticas, ou seja, infecções da polpa dentária e tecidos perirradiculares. É neste tipo de infecções que o gênero *Enterococcus* e mais especificamente a espécie *Enterococcus faecalis* assume um papel de elevada importância.

A espécie *Enterococcus faecalis* possui vários mecanismos de resistência que lhe permite sobreviver a diferentes tipos de intervenções de tratamento. Esta bactéria tem capacidade de formar biofilmes e possui vários fatores de virulência, que ditam o seu elevado grau de patogenicidade, os quais levam a infecções endodônticas muito persistentes mesmo após um segundo tratamento.

O sucesso do tratamento endodôntico está diretamente relacionado com a eliminação eficaz dos microrganismos do canal radicular. Neste âmbito, têm sido testadas várias terapias para eliminar com eficácia esta bactéria tais como, terapias com soluções assépticas ou até mesmo terapias com laser que têm demonstrado um resultado bastante positivo.

Palavras-chave

Cavidade oral; infecção endodôntica; *Enterococcus sp*; fatores de virulência, re-infecção, tratamento.

Abstract

The tooth is a very complex structure and a bacterial target that when it's not treated correctly can lead to endodontic infections, in other words, infections in the dental pulp and periradicular tissues. It's in this type of infections that *Enterococcus*, and more specifically the *Enterococcus faecalis* species, has a very important role.

The *Enterococcus faecalis* species has several mechanisms that allows it to survive to the several types of treatments. This bacterium has the ability to form biofilms and has virulence factors that dictate it's high pathogenicity degree, which leads to clinical unfavorable conditions, that can cause very persistent endodontic infections, even after a second treatment.

The success of the endodontic treatment is directly related to the effective elimination of the microorganisms of the root canal. In this area, it has been tested several therapies to effectively eliminate this bacterium, such as therapies with aseptic solutions or even laser therapies, that has been showing a very positive results.

Key-words

Oral cavity; endodontic infection; *Enterococcus sp.*; virulence factors; re-infection; treatment.

Dedicatórias

À minha família que sempre me apoiou tanto nos bons como nos maus momentos ao longo deste percurso de anos na procura da realização de um objetivo de vida e que agora se finaliza.

Aos meus pais que sempre me ensinaram os valores da vida, o sentido da responsabilidade, a motivação, a confiança que em mim depositaram... E também pela compreensão e carinho.

Ao João pelo amor, preocupação, apoio incondicional, presença em todos os momentos e também pela paciência.

À Sofia, a amiga desde a infância, que sempre me acompanhou em todos os momentos... Ora estudávamos, ora nos divertíamos.

Aos meus amigos pessoais adquiridos ao longo destes 5 anos que fizeram com que além do estudo tivéssemos momentos de descontração inesquecíveis... Em especial à Di, Ni, Sandra, Sara, Queu, Filipe, Cátia, Daniel e Ritinha.

Aos meus colegas de turma pelo stress em comunidade, pelo espírito de entre ajuda, pela necessidade de um desabafo e ter sempre alguém do lado... Sem eles não seria a mesma coisa.

Saudades...

Agradecimentos

À minha orientadora, Professora Doutora Cristina Pina pela disponibilidade, atenção, apoio e essencialmente conhecimentos transmitidos ao longo deste ano letivo.

Índice

I.	Introdução.....	1
1.	Cavidade oral.....	3
1.1.	Estrutura do dente.....	4
1.2.	Flora comensal da cavidade oral.....	6
1.3.	Formação de biofilmes.....	7
2.	Características do género <i>Enterococcus sp.</i>	9
2.1.	Fatores de virulência de <i>Enterococcus faecalis</i>	11
2.1.1.	Substâncias de agregação.....	12
2.1.2.	Adesinas de superfície.....	13
2.1.3.	Ácido lipoteicóico.....	15
2.1.4.	Produção extracelular de superóxido.....	16
2.1.5.	Enzima lítica gelatinase.....	17
2.1.6.	Hialuronidase.....	18
2.1.7.	Bacteriocinas.....	18
2.1.8.	Citolisinas.....	19
3.	Infeções endodônticas.....	20
3.1.	Infeções endodônticas por <i>Enterococcus sp.</i>	22
3.2.	Tratamento das infeções endodônticas.....	24
3.2.1.	Hipoclorito de sódio (NaOCl).....	25
3.2.2.	Gluconato de clorhexidina.....	26
3.2.3.	Hidróxido de cálcio.....	27
3.2.4.	Outras soluções antissépticas.....	27
3.2.5.	Antibioterapia.....	28
3.2.6.	Laser.....	30
II.	Considerações finais.....	32

III. Bibliografia..... 33

Índice de figuras

Figura 1: Visão ventral da cavidade oral..... 3
Figura 2: Corte longitudinal de um dente. 5
Figura 3: Imagem microscópica de *E. faecalis*, cocos gram positivo 10
Figura 4: Imagem de um isolamento de *E. faecalis*, colônias brancas em gelose de sangue de cavalo. 10
Figura 5: Imagem de um crescimento de *E. faecalis* e outra espécie de *Enterococcus* em meio de bilis-esculina. 11

Índice de tabelas

Tabela 1: Microrganismos que compõem a flora comensal oral..... 6
Tabela 2: Bactérias identificadas em infecções endodônticas. 21
Tabela 3: Antibióticos mais usados em Endodontia..... 29

Abreviaturas

AS ou Agg – Substância de agregação

°C – Graus Celsius

Ca(OH)₂ – Hidróxido de cálcio

CHX – Clorhexidina

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EDTA – Ácido dietilenodiaminotetracético

FCS – Faculdade de Ciências da Saúde

H₂O₂ – Peróxido de hidrogénio

LTA – Ácido lipoteicóico

mm – milímetro

NaOCl – Hipoclorito de sódio

PCR – Polymerase Chain Reaction

PDT – Terapia fotodinâmica

ROS – Espécies reativas de oxigénio

SOD – Superóxido dismutase

I. Introdução

Na cavidade oral de um indivíduo saudável, há uma grande diversidade bacteriana existindo mais de 700 espécies bacterianas colonizando diferentes locais (Aas *et al.*, 2005). Grande parte são bactérias anaeróbias, facultativas ou estritas, podendo ser bactérias de Gram positivo e de Gram negativo, cocos e bacilos (He *et al.*, 2012; Jorge, 1998; Beer *et al.*, 2006).

A flora considerada comensal da cavidade oral apesar de essencial pode causar em cerca de 80% da população Ocidental infecções, tais como as doenças periodontais e infecções endodônticas (Daves, 1996).

As infecções da boca podem ser prevenidas por métodos tradicionais mecânicos como a escovagem e passagem de fio dental mas nem sempre a sua eficácia é total levando a infecções profundas (Ciancio e Nisengard, 1997).

Após diagnóstico clínico de infecção endodôntica, ou seja, infecção da polpa dentária, o tratamento é normalmente mecânico, no sentido de eliminar a flora microbiana causadora de infecção. No entanto, aquando da presença de lesão periapical persistente, muitas vezes é apenas encontrada uma única espécie bacteriana (monoinfecção) - a espécie *Enterococcus faecalis* (Beer *et al.*, 2006). Também em determinadas situações, pode ocorrer uma reinfeção do canal e o género *Enterococcus* é normalmente um dos patogêneos presentes apresentando vários mecanismos de resistência e de patogenicidade. Assim, na cavidade oral a espécie *Enterococcus faecalis* é uma das bactérias com maior relevância clínica (Dahlén *et al.*, 2012).

Esta espécie dificulta o tratamento uma vez que desenvolve vários fatores de virulência os quais lhe permitem a sobrevivência em condições não ideais, como também resistências a antibióticos e a soluções como o hipoclorito de sódio (Laplace *et al.*, 1996).

Contudo, métodos de assepsia como o uso de hipoclorito de sódio, hidróxido de cálcio, clorohexidina ou até mesmo o uso de outros métodos como antibióticos profiláticos e outros compostos em monoterapia não têm demonstrado eficácia total na eliminação destas bactérias dos canais radiculares reinfectedos (Nacif e Alves, 2010; Athanassiadis *et al.*, 2007). No entanto, existem em estudo outros métodos como o uso sinérgico de cloreto de sódio com sorbato de potássio numa só solução que as combatem eficazmente (Van der Waal *et al.*, 2012b).

Atualmente, foram desenvolvidos métodos modernos como o uso de laser (terapia fotodinâmica, PDT) que provaram ser os mais infalíveis na eliminação de *Enterococcus faecalis* em canais radiculares contaminadas, sendo este o possível tratamento mais usado no futuro pela franca demonstração da sua eficiência (Fonseca *et al.*, 2008b).

O objetivo desta dissertação é realizar uma revisão bibliográfica atual das principais razões de infecções e reinfecções endodônticas causadas pelo género *Enterococcus*, com maior relevância para *Enterococcus faecalis*. Esta espécie tem um papel ativo em reinfecções da cavidade oral o qual se torna um problema de saúde pública, sendo muito importante o conhecimento das suas características microbiológicas e clínicas, no sentido de se compreender a sua presença nesses locais, permitindo assim uma melhor atuação do tratamento endodôntico, bem como ações preventivas de forma a evitar a reinfecção.

1. Cavidade oral

A cavidade oral (Figura 1) vulgarmente denominada de boca é a porção superior do tubo digestivo. É delimitada pelos lábios, fauce (orofaringe, garganta e abertura superior da faringe), bochechas, palato e pavimento muscular na parte inferior. Esta pode ser dissociada em duas áreas, o vestíbulo espaço de entrada localizado entre os lábios/bochecha e alvéolos dentários e a cavidade oral propriamente dita situada medialmente aos dentes (Seeley *et al.*, 2005).

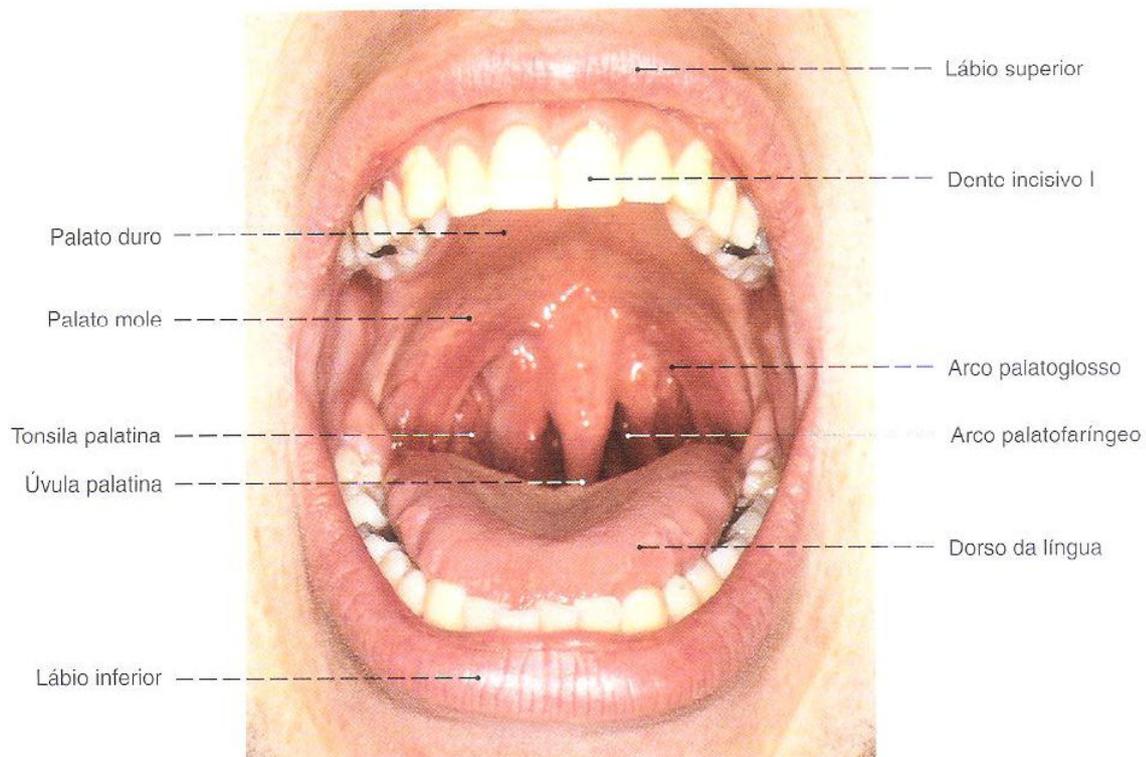


Figura 1: Visão ventral da cavidade oral (Putz e Pabst, 2000).

A boca é o espaço que permite a entrada e mastigação dos alimentos que vão posteriormente ser ingeridos, logo existe um consequente revestimento das superfícies, nomeadamente, dos dentes pelas bactérias que chegam a esta área através da alimentação.

Cada adulto possui 32 dentes que se encontram distribuídos simetricamente pelo maxilar e pela mandíbula. Nesta etapa da vida os dentes são de caracter definitivo (Seeley *et al.*, 2005; Figún e Garino, 2003).

Segundo Figún e Garino, 2003 os dentes são considerados um órgão, pela sua constituição ser de tecidos diferenciados e com origens embrionárias distintas. São duros, pequenos e apresentam um aspeto branco-amarelado.

1.1. Estrutura do dente

Pelo que já foi referido anteriormente, torna-se fundamental conhecer a estrutura do dente para se perceber como se pode manter os dentes saudáveis mas também como se forma uma doença/infeção nestas estruturas, sendo que é ele a unidade indispensável da mastigação.

Um dente pode ser organizado em três partes principais (Figura 2): a coroa que é a porção do dente que está visível e exposta na cavidade oral que pode apresentar uma ou mais cúspides, a raiz que se baseia nas projeções contidas no alvéolo e, por fim, o colo que forma a incorporação da raiz e da coroa (Seeley *et al.*, 2005).

Anatomicamente, a coroa é revestida por esmalte que se assemelha ao osso que é constituído por carbonato e fosfato de cálcio sendo assim a substância mais dura do corpo humano, é ele que protege o dente do desgaste promovido pela mastigação e da formação de ácidos que advém de produção bacteriana. É também a parte mais externa do dente (Seeley *et al.*, 2005).

A parte anterior ao esmalte e que circunda o dente designa-se de dentina sendo ela a forma básica do dente e que lhe confere rigidez. Ela ostenta tecido celularmente ativo e calcificado. Na raiz a dentina é revestida superficialmente pelo cimento que tem como função auxiliar a fixação do dente ao maxilar. A dentina envolve a cavidade polpar que á um espaço inteirado com vasos sanguíneos, nervos e tecido conjuntivo que dá forma à polpa. Uma vez que a cavidade polpar penetra na raiz forma-se um canal e a essa porção dá-se o nome de canal radicular. Assim, é necessária a existência de um orifício na extremidade de cada raiz para que os nervos e vasos sanguíneos introduzidos na polpa

possam sair a fim de nutrir o dente, esse orifício designa-se de buraco apical (Seeley *et al.*, 2005; Tortora, 2001; Figún e Garino, 2003).

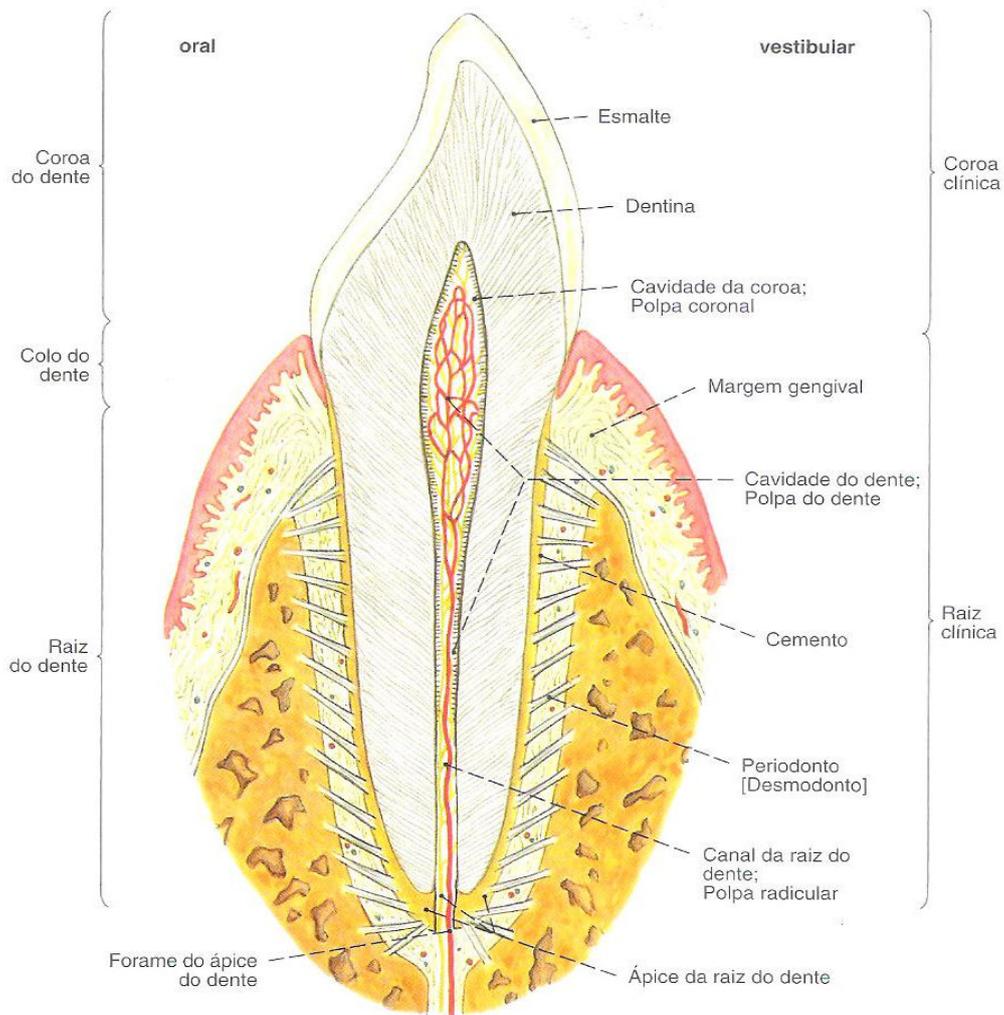


Figura 2: Corte longitudinal de um dente (Putz e Pabst, 2000).

Globalmente, os dentes encontram-se introduzidos nos alvéolos ancorados pelos ligamentos periodontais que constituem a gengiva (Seeley *et al.*, 2005; Tortora, 2001; Figún e Garino, 2003).

1.2. Flora comensal da cavidade oral

Na cavidade oral existe um conjunto de organismos muito variado que inclui bactérias, fungos, parasitas e vírus mas é o grupo das bactérias que apresenta uma maior predominância. Encontram-se mais de 700 espécies de bactérias diferentes residentes na boca, como se pode observar na seguinte tabela que sintetiza a natureza da flora comensal da boca (Samaranayake, 1996).

Tabela 1: Microrganismos que compõem a flora comensal oral (adaptado de Jorge, 1998 e Samaranayake, 1996).

Característica	Gêneros
Cocos Gram-positivos	<i>Streptococcus</i> <i>Stomatococcus</i> <i>Staphylococcus</i> <i>Peptostreptococcus</i>
Cocos Gram-negativos	<i>Neisseria</i> <i>Veillonella</i> <i>Branhamella</i>
Bacilos Gram-positivos	<i>Lactobacillus</i> <i>Corynebacterium</i> <i>Arachnia</i> <i>Rothia</i> <i>Eubacterium</i> <i>Actinomyces</i> <i>Bifidobacterium</i>
Bacilos Gram-negativos anaeróbios estritos	<i>Bacteroides</i> <i>Prevotella</i> <i>Porphyromonas</i> <i>Fusobacterium</i> <i>Leptotrichia</i> <i>Wolinella</i> <i>Selenomonas</i> <i>Treponema</i>
Bacilos Gram-negativos móveis	<i>Campylobacter</i> <i>Capnocytophaga</i>
Bacilos Gram-negativos anaeróbios facultativos	<i>Haemophilus</i> <i>Actinobacillus</i> <i>Eikenella</i>
Micoplasmas	<i>Mycoplasma</i> <i>Ureaplasma</i> <i>Acholeplasma</i>

Contudo, e por fazerem parte da nossa flora comensal, os microrganismos apresentam ligações com o hospedeiro que podem ser consideradas positivas. Estas relações entre o hospedeiro e o microrganismo podem ser de comensalismo não provocando qualquer dano no hospedeiro, logo não se afetam mutuamente, não existe um efeito benéfico nem maléfico, mas também podem ter uma relação de anfibiose em que esta se divide em relação de simbiose (benéfica e segura para ambos) ou então relação de antibiose (nefasta e instável para ambos) podendo ocorrer uma ou outra (Jorge, 1998; Loesche, 1997).

A cavidade oral apresenta vários locais e conseqüentemente, pela sua anatomia comporta uma comunidade bacteriana muito variada e característica de cada local dificultando o seu estudo (Aas *et al.*, 2005; Jorge, 1998).

1.3. Formação de biofilmes

Segundo Portenier (2003) “*Muitos microrganismos ligados a uma superfície formam uma comunidade bacteriana – Biofilme.*” (Portenier *et al.*, 2003).

A microbiota da cavidade oral é considerada numa perspectiva ecológica um sistema de crescimento aberto, ou seja os nutrientes e os microrganismos estão em constante e repetida introdução e remoção do sistema em questão. Estas características demonstram que a flora da boca é própria e na sua maioria não coloniza outros locais do corpo humano, formando um biofilme muito complexo (Jorge, 1998).

Por definição os biofilmes são estruturas complexamente organizadas que se compõem transversalmente por um aglomerado de bactérias, que estruturalmente se assemelham a um cogumelo. Estes aglomerados possuem uma matriz de polissacarídeos e proteínas que formam uma camada viscosa, que possibilita a formação de canais de água que permitem a entrada de nutrientes desejados e a saída de resíduos (Portenier *et al.*, 2003; Chai *et al.*, 2007).

Assim, os biofilmes promovem um modo de desenvolvimento bacteriano protegido de forma a permitir o crescimento em ambientes desfavoráveis, podem ser formações bacterianas da mesma espécie ou de espécies diferentes que cooperam entre si (Costerton *et al.*, 1999; Hall-Stoodley *et al.*, 2004; Behlau e Gilmore, 2010).

São estas condições que oferecem maiores vantagens, possibilitam um mais fácil acesso a nutrientes que interferem na taxa de crescimento bacteriano bem como, trocas metabólicas e proteção contra fatores externos. Também a proximidade entre as bactérias favorece uma relação sinérgica entre elas mesmo entre bactérias de espécies diferentes. Esta relação/interação inclui permuta horizontal de material genético e partição de produtos metabólicos que conseqüentemente conduzem a uma maior tolerância a antimicrobianos, a proteção a stress ambiental ou até mesmo proteção contra o sistema imunitário do hospedeiro. Tudo isto conduz a uma dificuldade permanente em eliminar os biofilmes (Prakash *et al.*, 2003; Behlau e Gilmore, 2010; Davey e O'Toole, 2000).

É de extrema importância a visualização e identificação bacteriana de um biofilme. Pode-se utilizar microscopia eletrônica de varredura que permite uma aproximação útil da imagem de um biofilme bacteriano no seu ambiente natural onde se incluem o habitat dentário, porque é a partir desta visualização que é permitida a investigação de grandes superfícies com uma resolução de características topográficas excelentes. Contudo, nos biofilmes existe uma camada espessa de matriz extracelular que impede uma clara visualização individualizada das bactérias presentes no aglomerado. Mas isto pode ser ultrapassado utilizando-se microscopia confocal com varrimento a laser em combinação com hibridização *in situ* por fluorescência que possibilita uma observação da matriz bacteriana em multi-camadas de biofilmes. Utilizando-se as duas técnicas em conjunto ultrapassam-se as limitações de cada técnica (Schaudinn *et al.*, 2009).

O gênero *Enterococcus* tem uma especial capacidade para a formação de biofilmes o que lhes permite uma maior facilidade de colonização de superfícies inertes e biológicas. Assim, o microrganismo fica protegido dos agentes antimicrobianos e do sistema imunitário, intervindo também na ação de adesão e invasão das células do hospedeiro (Baldassarri *et al.*, 2005).

2. Características do gênero *Enterococcus sp.*

Enterococcus são bactérias de Gram positivo de origem entérica, foram nos anos 30 classificados como pertencentes ao gênero *Streptococcus*. Contudo, com o avanço dos testes serológicos de Lancefield agregaram-nos como *Streptococcus* do grupo D separando assim os *Streptococcus* do grupo D entéricos, como exemplo, *Streptococcus faecalis*, dos considerados não entéricos, como exemplo, os *Streptococcus bovis*, com base nas suas características bioquímicas. Então Sherman propôs uma nova caracterização, dividindo filogeneticamente o gênero *Streptococcus* dos quais se diferenciaram os *Enterococcus*. Segundo o mesmo autor também seriam designados por *Enterococcus* todos os *Streptococcus* que crescessem de 10 a 45°C, em meio de NaCl com concentração de 6,5%, a um pH de 9,6, e ainda que sobrevivessem a um aquecimento de 60°C durante 30 minutos. Também deveriam hidrolisar a esculina na presença de bÍlis (Portenier *et al.*, 2003; Murray, 1990).

Foi já nos anos 80 que foram reclassificados tornando-se no gênero *Enterococcus* pelas diferenças genéticas observadas. Assim, todas as espécies anteriormente identificadas com as características acima referidas passaram a pertencer ao gênero *Enterococcus* e não *Streptococcus*, como se pode observar nas espécies conhecidas hoje por *Enterococcus faecalis* ou *Enterococcus faecium* (Murray, 1990; Sreeja *et al.*, 2012; Cetinkaya *et al.*, 2000).

Dentro do gênero *Enterococcus* já foram identificadas cerca de 12 espécies patogênicas isoladas em seres humanos, mas as espécies que apresentam maior relevância a nível sanitário no Homem são a espécie *Enterococcus faecium* e a espécie *Enterococcus faecalis* (Murray, 1990; Sreeja *et al.*, 2012). Em mais de 90% das infeções está presente a espécie *Enterococcus faecalis* e as restantes são causadas pela espécie *Enterococcus faecium*, muito raramente têm causa por outra espécie de *Enterococcus* (Jett *et al.*, 1994).

O gênero *Enterococcus* como acima referido, e tal como o nome indica têm a forma de cocos (Figura 3) e são Gram positivo. Podem agrupar-se em cadeias curtas ou isoladamente. Estas bactérias são anaeróbias facultativas o que significa que têm a capacidade de sobreviver tanto na presença de oxigénio como na ausência dele, sendo catalase negativo. São bactérias formadoras de colónias e são não esporulada (Junior *et*

al., 2002; Portenier *et al.*, 2003; Nacif e Alves, 2010; Paradella *et al.*, 2007; Stuart *et al.*, 2006; Cetinkaya *et al.*, 2000).

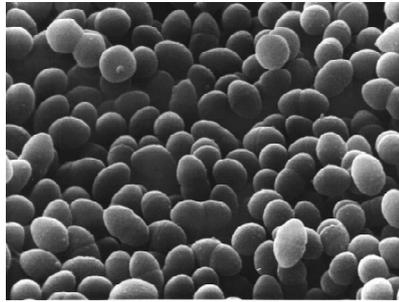


Figura 3: Imagem microscópica de *E. faecalis*, cocos Gram positivo (Adaptado de Phillips, 1995)

Possuem um crescimento ótimo a uma temperatura de 35°C, podendo resistir a outras temperaturas. Aquando de um isolamento em gelose de sangue e ao fim de 24 horas observa-se o crescimento de colónias brancas (Figura 4) com diâmetro de 1 a 2 mm embora possam existir também colónias com diâmetro inferior (Nacif e Alves, 2010).

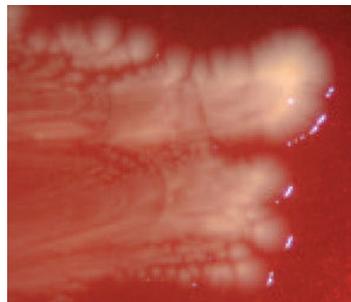


Figura 4: Imagem de um isolamento de *E. faecalis*, colónias brancas em gelose de sangue de cavalo (Adaptado de Portenier, 2003).

Estas bactérias na sua grande maioria são gama hemolíticas em meios de gelose de sangue.

Metabolicamente produzem ácido láctico resultante da fermentação de glicose e não produzem gás (Portenier *et al.*, 2003).

Para além da hidrólise da esculina na presença de bilis como já acima referenciado, estas bactérias podem ainda hidrolisar a leucina- β -naftilamida pela produção de leucina

aminopeptidase. Algumas espécies são móveis e outras formam pigmentos (Murray, 1990; Cetinkaya *et al.*, 2000).

De notar que são necessários testes fenotípicos para identificar o género presente, como por exemplo, testes de fermentação e bilis-esculina (Figura 5) (Nacif e Alves, 2010; Paradella *et al.*, 2007; Murray, 1990; Cetinkaya *et al.*, 2000). Também de uma forma mais específica pode-se recorrer a métodos de biologia molecular, tais como PCR, Polymerase Chain Reaction, ou galerias de Api, como Api 20 Strep (bioMerieux) (Liassine *et al.*, 1998; Silva *et al.*, 2013; Diarra *et al.*, 2010; Paradella *et al.*, 2007; Hamilton-Miller e Shah, 1999).



Figura 5: Imagem de um crescimento de *E. faecalis* e outra espécie de *Enterococcus* em meio de bilis-esculina (Adaptado de Portenier, 2003).

2.1. Fatores de virulência de *Enterococcus faecalis*

As bactérias que colonizam um determinado local de um organismo têm necessidade de produzir fatores de virulência quando se deparam com um meio que não é ideal à sua continuidade. Assim, apenas os microrganismos com capacidade de aderência às superfícies dos tecidos e às matrizes extracelulares ou com alguma outra capacidade de permanência ficam retidas, podendo causar infeção pela facilidade de invasão (Jorge, 1998).

Os fatores de virulência da espécie *Enterococcus faecalis* pertencem a genes codificados que lhes permitem escapar aos mecanismos de defesa do hospedeiro ou até mesmo competir com outras células bacterianas através da produção de toxinas ou até mesmo através da indução da inflamação pois são capazes de gerar os mecanismos de

imunomodulação onde abaixo se irá abordar mais detalhadamente (Portenier *et al.*, 2003; Nacif e Alves, 2010).

2.1.1. Substâncias de agregação

A substância de agregação (cuja abreviatura pode ser AS ou Agg dependendo do autor) é uma adesina bacteriana que é codificada por um plasmídeo que responde a feromonas de indução (glicoproteína de superfície) permitindo o contato eficaz entre o hospedeiro e o recetor bacteriano. Espécies que não possuam esta substância não têm uma ligação eficiente (Waters e Dunny, 2001; Fisher e Phillips, 2009; Portenier *et al.*, 2003; Paradella *et al.*, 2007; Camargo *et al.*, 2008; Kayaoglu e Orstavik, 2004; Jett *et al.*, 1994).

A substância de agregação tem natureza proteica assim a sua expressão à superfície da célula pode ser induzida por soro. Existem vários genes que codificam a AS dos quais se destacam o ASA1, ASC10 e ASA373 que apesar de pertencerem à família da AS diferem na estrutura proteica (Paradella *et al.*, 2007).

É esta substância que fomenta a adesão direta de *Enterococcus faecalis*, independentemente da opsonina, a neutrófilos humanos por mecanismos mediados pelos recetores do complemento, tornando a espécie resistente à fagocitose executada pelos neutrófilos. Também espécies capazes de produzir AS como *Enterococcus* produzem superóxidos extracelularmente os quais formam danos teciduais aquando de infeção. Similarmente, medeiam ligações à matriz extracelular como o colagénio do tipo I, que curiosamente é um fator vinculativo pois o colagénio é um componente orgânico constitutivo da dentina levando a uma particular importância nas infeções endodônticas.

É igualmente relevante saber que os superantígenos são moléculas produzidas por bactérias, fungos e/ou parasitas que podem induzir a inflamação atuando na estimulação de linfócitos T que levam à produção de citocinas inflamatórias resultando mais uma vez em danos teciduais, então a associação de AS com a substância ligante comporta-se como um superantígeno desencadeando os vários mecanismos de reação do sistema

imunitário causando a destruição celular (Portenier *et al.*, 2003; Paradella *et al.*, 2007; Camargo *et al.*, 2008; Kayaoglu e Orstavik, 2004; Jett *et al.*, 1994).

Denote-se que a substância de agregação aumenta a hidrofobicidade da superfície celular de *Enterococcus* o que conseqüentemente induz a localização de colesterol pelos fagossomas que atrasam ou evitam a fusão com as vesículas lisossomais (Fisher e Phillips, 2009).

Em estudos *in vivo* demonstra-se que a AS de *Enterococcus faecalis* são capazes de formar agregados enormes aumentando o risco de patogênese (Waters e Dunny, 2001; Fisher e Phillips, 2009; Portenier *et al.*, 2003; Paradella *et al.*, 2007; Camargo *et al.*, 2008; Kayaoglu e Orstavik, 2004; Jett *et al.*, 1994).

2.1.2. Adesinas de superfície

As adesinas de superfície são codificadas pelo gene *esp* e são proteínas de elevado peso molecular denominadas de proteínas de superfície *esp* (Arana *et al.*, 2001; Portenier *et al.*, 2003; Paradella *et al.*, 2007; M.Love *et al.*, 1997; Kayaoglu e Orstavik, 2004).

A *esp* está diretamente relacionada com a formação e fixação primária de biofilme pela espécie *Enterococcus*, vários estudos já demonstraram que se existir alguma anomalia deste gene a espécie torna-se incapaz de formar biofilme, assim verifica-se a presença de uma associação genética entre a presença de *esp* e a presença de adesinas. Especula-se que o gene *esp* possa ter uma ligação direta à fixação dos ligandos na matriz extracelular ou até mesmo uma ligação indireta na modulação da atividade de ligandos de outras moléculas. Também se pensa que este gene possa estar aliado ao aumento da hidrofobicidade, ou seja, a facilidade de interações hidrofóbicas. Assim, alguns estudos recentes demonstraram que na presença da proteína *esp* de superfície aumenta a hidrofobicidade e, conseqüentemente aumenta a formação e adesão de biofilmes em superfícies bióticas (Arana *et al.*, 2001; Portenier *et al.*, 2003; Paradella *et al.*, 2007; M.Love *et al.*, 1997; Kayaoglu e Orstavik, 2004).

Similarmente, alguns estudos demonstraram que com a formação de biofilmes e na presença de adesinas a espécie *Enterococcus faecalis* tem capacidade mesmo em

paredes dentinárias medicadas de resistir a bactericidas como o hidróxido de cálcio em canais com raízes infetadas (Paradella *et al.*, 2007; Kayaoglu e Orstavik, 2004).

Também o gene *efaA* adquire extrema importância na adesão de microrganismos. A sequência de aminoácidos associados à proteína *efaA* codificada pelo gene *efaA* apresentou uma homologia de 55 a 60% das proteínas de *Streptococcus* conhecidas como adesinas, daí a hipótese de ser uma adesina sendo comum a produção destas proteínas na espécie *Enterococcus faecalis*.

Por outro lado, o *efaA* é uma proteína de ligação aos receptores num sistema de transporte de manganês que é um catião fundamental à sobrevivência da maioria dos microrganismos. Este gene expressa-se fortemente num meio cuja quantidade de manganês não seja muito elevada, provavelmente pela regulação da homeostase citoplasmática do catião. Uma vez que na dentina a disponibilidade de manganês é reduzida este gene expressa-se com facilidade, é altamente induzido (Kayaoglu e Orstavik, 2004).

Alguns estudos despoletaram uma hipótese que se foca em fatores associados à ligação de bactérias à matriz extracelular de proteínas. Várias estirpes de *Enterococcus faecalis* foram detetadas a aglutinar fortemente com as proteínas da matriz extracelular, inclusivamente com o colagénio do tipo I e do tipo IV o que foi atribuído ao aumento da hidrofobicidade da superfície das células. Esta ligação foi posteriormente identificada como Ace que é fundamentalmente uma ligação de colagénio MSCRAMM, ou seja componente de superfície microbiana que reconhece moléculas de superfície adesiva, que é estruturalmente e funcionalmente idêntica à proteína de ligação do colagénio de *Staphylococcus aureus*. Recentemente, foi demonstrado que a influência da Ace na aderência à dentina depende da estirpe, da temperatura de incubação mas também da protease da serina que auxilia a adesão das bactérias à dentina expondo locais de ligação para as adesinas ou até mesmo modificando as adesinas. Estirpe de *Enterococcus faecalis* não é inibida aquando da invasão da dentina e ainda a ligação do colagénio é reforçada (Arana *et al.*, 2001; Portenier *et al.*, 2003; Paradella *et al.*, 2007; M.Love *et al.*, 1997; Kayaoglu e Orstavik, 2004).

2.1.3. Ácido lipoteicóico

O ácido lipoteicóico (LTA) é uma molécula anfifílica ou anfipática que está incorporada na parede celular das bactérias Gram positivo como os *Enterococcus faecalis*, é um polímero de glicerol fosfato covalentemente ligado a um glicolípido da membrana citoplasmática que se projeta na camada de peptidoglicano. É esta fração lipídica que facilita/auxilia a ligação das bactérias às células eucarióticas do hospedeiro como as plaquetas, eritrócitos, linfócitos, leucócitos e células epiteliais (Kayaoglu e Orstavik, 2004; Jett *et al.*, 1994).

Por ser capaz de ativar os macrófagos e monócitos induz a liberação de citocinas inflamatórias das quais se destacam as IL-1 α , IL-6, TNF e CXCL8- α , iniciando os seus efeitos por sinalização por via da TLR-2. É também competente para ativar o sistema de complemento que implica o dano tecidual. Os eritrócitos que se encontram ligados a LTAs ficam susceptíveis a lise, pois fica exposta ao seu próprio sistema de complemento aquando de indicação de dano tecidual ao longo de uma infeção bacteriana (Kayaoglu e Orstavik, 2004).

O LTA constitutivo da parede celular de *Enterococcus faecalis* pode ainda causar apoptose que é um fenómeno de morte celular programada que não provoca danos nas células contíguas que decorre ao longo de toda a vida celular. Este fenómeno de apoptose, em particular nesta situação, é estimulado em linhas celulares relevantes como osteoblastos, osteoclastos, macrófagos, neutrófilos e essencialmente fibroblastos de ligamentos periodontais (Kayaoglu e Orstavik, 2004).

Existem estudos que revelam que o LTA está diretamente associado aos fenómenos de resistências a medicamentos utilizados essencialmente em tratamentos endodônticos (Jr. e Rôças, 2007; Kayaoglu e Orstavik, 2004).

Pode-se então concluir que o LTA é considerado como uma substância que permite a ligação da espécie *Enterococcus faecalis* à célula do hospedeiro daí o seu tributo para a virulência da espécie pois possibilita a formação de agregados e posterior transferência de plasmídeos modulando respostas inflamatórias (Jr. e Rôças, 2007; Paradella *et al.*, 2007; Kayaoglu e Orstavik, 2004; Jett *et al.*, 1994).

2.1.4. Produção extracelular de superóxido dismutase

O anião superóxido é um anião com um átomo de oxigénio altamente reativo. Os radicais livres como o superóxido e o radical hidroxilo são oxidantes biológicos extremamente eficazes que são originados nos fagócitos ao longo de uma resposta de tecido normal a uma lesão ou infeção (Davis *et al.*, 1991; Kayaoglu e Orstavik, 2004).

Nas células do hospedeiro os radicais livres provenientes do oxigénio são orientados por vários mecanismos de defesa celular tanto enzimáticos dos quais se destacam a superóxido dismutase como não enzimáticos. A superóxido dismutase ou SOD promove a dismutação de radicais superóxido em oxigénio molecular e peróxido de hidrogénio aquando da inativação de microrganismos ou de inativação de produtos tóxicos (Davis *et al.*, 1991; Tulunoglu *et al.*, 1998; Kayaoglu e Orstavik, 2004).

Na inflamação da polpa dentária dá-se a libertação de uma enorme diversidade de moléculas com elevado poder oxidante denominadas de espécies reativas de oxigénio (ROS), que são normalmente eliminadas *in vivo* por antioxidantes poderosos, mas durante a inflamação este poder é minimizado limitando a resposta inflamatória. Assim, a enzima SOD numa inflamação que atua como protectora, apresenta um desempenho baixo no início da inflamação porque se esgota por destruição, mantendo-se a inflamação, com o avançar da idade esta enzima também tem tendência a ser diminuída.

Finalizando, esta enzima pode ser construtiva ou completamente destrutiva mediante da sua produção. Se produzida por neutrófilos assume um papel construtivo na eliminação de microrganismos, mas se se produz um radical de oxigénio este torna-se altamente destrutivo levando ao dano de lípidos, proteínas e ácidos nucleicos que são componentes celulares essenciais (Baumgardner e Sulfaro, 2001).

Este anião pode ser produzido tanto nas células do hospedeiro como anteriormente já foi referido, mas também nas células bacterianas extracelularmente e está diretamente envolvido no dano tecidual com várias desordens como exemplo em danos do foro inflamatório. Esta produção é comum na espécie *Enterococcus faecalis* promovendo a sua sobrevivência (Baumgardner e Sulfaro, 2001; Davis *et al.*, 1991; Tulunoglu *et al.*, 1998; Kayaoglu e Orstavik, 2004).

Em condições aeróbias, por excelência, produz-se radicais de oxigénio, aparentemente este radical é não reativo nas membranas celulares mas em condições de acidez catalisa instantaneamente peróxido de hidrogénio. Por ser uma espécie fermentadora e formadora de ácido láctico acidifica o meio envolvente favorecendo a formação de peróxido de hidrogénio, o que permite com que difunda facilmente nas membranas celulares (Verneuil *et al.*, 2006).

2.1.5. Enzima lítica gelatinase

O gene gel E codifica a enzima gelatinase. A enzima gelatinase é uma metaloprotease extracelular (MMP) constituída por zinco com capacidade para hidrolisar gelatina, colagénio, caseína, hemoglobina e outros péptidos de pequenas dimensões e biologicamente ativos.

A gelatinase bacteriana atua de forma similar à gelatinase do hospedeiro desempenhando funções fisiológicas normais tais como a regulação da formação e remodelação de tecidos por meio de degradação da matriz extracelular. Contudo, se existir uma deficiente regulação deste processo podem se desenvolver doenças tais como cancro e periodontite (Fisher e Phillips, 2009; Paradella *et al.*, 2007; Kayaoglu e Orstavik, 2004; Jett *et al.*, 1994).

Segundo alguns estudos, na cavidade oral de um indivíduo com doença periodontal podem encontrar-se níveis elevados de gelatinase A, MMP-2 e gelatinase B, MMP-9, pois quanto maior a quantidade de gelatinase maior será o fornecimento de nutrientes para as bactérias provenientes do tecido degradado do hospedeiro. Esta enzima tem vindo a ser conhecida como causadora de lesões periapicais e inflamações da polpa bem como tem sido responsabilizada pela degradação da matriz orgânica da dentina (Fisher e Phillips, 2009; Paradella *et al.*, 2007; Menezes-Silva *et al.*, 2012; Kayaoglu e Orstavik, 2004; Jett *et al.*, 1994).

Por serem ambas protéases por analogia com o descrito a protéase serina comporta-se da mesma forma que a gelatinase (Fisher e Phillips, 2009; Paradella *et al.*, 2007; Menezes-Silva *et al.*, 2012; Kayaoglu e Orstavik, 2004; Jett *et al.*, 1994).

2.1.6. Hialuronidase

A enzima hialuronidase é codificada pelo gene *hyl*. A hialuronidase está associada ao dano tecidual por consequência da sua atividade. Ela é uma enzima de degradação do ácido hialurônico. A hialuronidase promove a despolimerização dos radicais dos mucopolissacarídeos do tecido conjuntivo o que consequentemente aumenta a capacidade de invasão bacteriana.

Na cavidade oral numa dentina cariada pode ser isolado ácido hialurônico de proveniência bacteriana para substrato da enzima, o que sugere que *E. faecalis* tem capacidade para derivar carbono essencial que lhe permite sobreviver por hidrólise do substrato.

Quanto maior a atividade das hialuronidases numa cárie dentária maior a sintomatologia (Fisher e Phillips, 2009; Paradella *et al.*, 2007; Kayaoglu e Orstavik, 2004; Jett *et al.*, 1994).

2.1.7. Bacteriocinas

As bacteriocinas são proteínas anfifílicas catiónicas que contém uma quantidade ou até mesmo nenhuma de cisteína e a sua estrutura surge em meio aquoso (Fisher e Phillips, 2009).

As bacteriocinas são formadas a partir de quatro genes: um gene estrutural, um gene de imunidade específica, um gene de imunidade ABC e um gene que codifica uma proteína de transporte da bacteriocina. Elas são sintetizadas nos ribossomas e, posteriormente lançadas como peptídeos extracelulares que permitem a atividade antimicrobiana.

O género *Enterococcus* caracteristicamente produz vários tipos enterocinas, sendo de destacar que a espécie de *Enterococcus faecalis* produz a enterocina Ej97, a enterocina AS-48 e as enterocinas 1071A e 1071B, já a espécie *Enterococcus faecium* produz uma maior variedade de enterocinas sendo de destacar a enterocina A e B, a enterocina P e enterocina CRL35 (Fisher e Phillips, 2009; Kayaoglu e Orstavik, 2004).

As bacteriocinas em contato com a membrana celular adquirem uma forma helicoidal que lhes permite a incorporação na célula formando um poro causando a saída de iões

potássio, a disseminação do potencial de membrana e também a interdição da absorção de aminoácidos levando à morte celular (Fisher e Phillips, 2009; Kayaoglu e Orstavik, 2004).

2.1.8. Citolisinas

As citolisinas são consideradas hemolisinas produzidas por *Enterococcus faecalis* Beta-hemolíticos e são codificados por plasmídeos, podendo também ser codificadas cromossomicamente (Portenier *et al.*, 2003; Kayaoglu e Orstavik, 2004; Jett *et al.*, 1994).

Com a análise baseada num aminoácido purificado a citolisina da espécie *Enterococcus faecalis* foi classificada como lantibiótico do tipo A. Os lantibióticos são péptidos sintetizados a nível dos ribossomas que contêm o aminoácido lantionina mas também outros aminoácidos modificados que não formam em condições normais proteínas. Estes lantibióticos são capazes de exercer atividade antimicrobiana originando poros na membrana citoplasmática das bactérias e das células formando vesículas fosfolipídicas artificiais (Portenier *et al.*, 2003; Jett *et al.*, 1994).

Assim, as citolisinas são capazes de provocar a lise de eritrócitos e de componentes polimorfonucleares, como neutrófilos e macrófagos causando a morte de bactérias e células que conduz ao fenómeno de fagocitose (Portenier *et al.*, 2003; Kayaoglu e Orstavik, 2004; Jett *et al.*, 1994).

3. Infecções endodônticas

Segundo a *American Association of Endodontists* (2013), endodontia é um ramo de especialização do médico dentista e tem como finalidade o estudo e tratamento específico do interior do dente, ou seja polpa dentária e tecidos perirradiculares. O nome deriva do grego, “Endo” de dentro e “odonto” de dente.

Torna-se então necessária a intervenção endodôntica quando a polpa que é o tecido mole do dente fica inflamada ou infetada, e este processo pode apresentar várias causas como cáries profundas, fenda do dente ou então procedimentos repetidos sobre o dente. Se não existir intervenção nestes tipos de problemas dentários estes podem conduzir à dor ou até mesmo à criação de abscessos.

Assim, o procedimento mais comum será remover a polpa contaminada e proceder à limpeza e modelação do interior do canal, que posteriormente é cheio e selado ficando restaurado e novamente no seu funcionamento normal (*American Association of Endodontists*, 2013).

Como já referido anteriormente no capítulo da flora comensal, a cavidade oral apresenta várias espécies bacterianas residentes que podem ser oportunistas podendo causar infeção endodôntica.

Na tabela 2 apresenta-se as principais bactérias com capacidade de causar infeções endodônticas:

Tabela 2: Bactérias identificadas em infecções endodônticas (adaptado de Narayanan, 2010, Peciulienė, 2008 e Jr, 2008).

	<u>Espécies</u>
<u>Infecções Primárias</u>	<ul style="list-style-type: none">• <i>Prevotella intermedia</i>• <i>Prevotella nigrescens</i>• <i>Prevotella tanneriae</i>• <i>Prevotella multissacharivorax</i>• <i>Prevotella baroniae</i>• <i>Prevotella denticola</i>• <i>Porphyromonas endodontalis</i>• <i>Porphyromonas gingivalis</i>• <i>Tannerella forsythia</i>• <i>Dialister pneumosintes</i>• <i>Dialister invisus</i>• <i>Fusobacterium nucleatum</i> • <i>Fusobacterium periodonticum</i>• <i>Treponema denticola</i>• <i>Treponema sacranskii</i>• <i>Treponema parvum</i>• <i>Treponema maltophilum</i>• <i>Treponema lecithinolyticum</i>• <i>Pseudoramibacter alactolyticus</i>• <i>Filifactor alocis</i>• <i>Actinomyces</i> spp.• <i>Propionibacterium propionicum</i>• <i>Olsenella</i> spp.• <i>Slackia exigua</i>• <i>Mogibacterium timidum</i>• <i>Eubacterium</i>• <i>Parvimonas micra</i>• <i>Streptococcus</i> spp.• <i>Enterococcus faecalis</i>• <i>Campylobacter</i> spp.• <i>Catonella morbic</i>• <i>Veillonella parvula</i>• <i>Eikenella corrodens</i>• <i>Granulicatella adiacens</i>• <i>Neisseria mucosa</i>• <i>Centipeda periodontii</i>• <i>Gemella morbillorum</i>• <i>Capnocytophaga gingivalis</i>• <i>Corynebacterium matruchotii</i>• <i>Bifidobacterium dentium</i>• <i>Anaerobic lactobacilli</i>

Tabela 3: Bactérias identificadas em infecções endodônticas (adaptado de Narayanan, 2010, Peciuliene, 2008 e Jr, 2008).

<u>Infeções Persistentes</u>	<ul style="list-style-type: none">• <i>Fusobacterium nucleatum</i>• <i>Prevotella spp.</i>• <i>Campylobacter rectus</i>• <i>Streptococcus spp.</i>• <i>Lactobacillus spp.</i>• <i>Staphylococcus spp.</i>• <i>Enterococcus faecalis</i>• <i>Olsenella uli</i>• <i>Parvimonas micra</i>• <i>Pseudoramibacter alactolyticus</i>• <i>Propionibacterium spp.</i>• <i>Actinomyces spp.</i>• <i>Bifidobacterium spp.</i>• <i>Eubacterium spp.</i>• <i>Candida Albicans (levedura)</i>
-------------------------------------	---

3.1. Infecções endodônticas por *Enterococcus sp.*

A espécie *Enterococcus faecalis* está relacionada com vários tipos de infecções endodônticas consideradas primárias ou secundárias ou persistentes possuindo um grau de prevalência consoante o seu tipo. Por serem clinicamente muito difíceis de distinguir as infecções secundárias das persistentes elas foram agrupadas em infecções secundárias persistentes.

A prevalência da espécie apontada por alguns estudos numa infecção primária foi associada recentemente e é de 4 a 67,5%. Já a prevalência de uma infecção secundária provocada pela mesma espécie aumenta exponencialmente para 24 a 77%.

A espécie *Enterococcus faecalis* suprime de uma forma exemplar a ação dos linfócitos contribuindo para a falha do tratamento endodôntico. A espécie invade eficazmente os sistemas de canais radiculares e túbulos dentinários conduzindo à recolonização e reinfeção dos canais. Vários autores defendem que esta espécie está diretamente relacionada com vários casos assintomáticos em infecções endodônticas primárias do que

em casos sintomáticos. Em contrapartida também é encontrada e em maior quantidade em infecções secundários cujo primeiro tratamento falhou.

Estando a espécie intimamente ligada a ambas tipologias de infecção endodôntica assume-se um papel fundamental na abordagem terapêutica a aplicar de desinfecção como procedimento endodôntico (Roças *et al.*, 2004; Nacif e Alves, 2010; Paradella *et al.*, 2007; Stuart *et al.*, 2006; M.Love *et al.*, 1997; Jr. e Roças, 2004; Lee *et al.*, 2004; Kayaoglu e Orstavik, 2004; Jett *et al.*, 1994).

3.2. Tratamento das infecções endodônticas

As infecções endodônticas apenas são passíveis de tratar através de procedimentos químicos e mecânicos locais, pois os sistemas de canais radiculares estão localizados privilegiadamente de forma a que nem os antibióticos administrados sistemicamente nem o sistema de defesa das células do hospedeiro consigam eliminar as bactérias presentes. Assim, torna-se fundamental conhecer as limitações das substâncias desinfetantes que eventualmente poderão eliminar a espécie *Enterococcus faecalis*.

A infecção poderá então ser controlada dependendo da preparação química/mecânica e medicação intracanal (Jr. e Roças, 2008).

Para uma melhor homogeneidade de tratamento foram criados objetivos básicos de desinfecção e instrumentação que se baseiam em:

- Remover tecidos moles e tecidos duros que estejam potencialmente infetados;
- Permitir que os irrigantes tenham acesso à porção apical do canal;
- Criar um espaço para introduzir a medicação e posteriormente efetuar a obturação;
- Preservar íntegra a organização radicular.

A instrumentação usada nos sistemas de canais radiculares pode ser de carácter manual ou mecanizada segundo o tipo de abordagem. Dependendo do calibre da instrumentação a eliminação de bactérias presentes intratubularmente pode ou não ser mais eficaz porque quanto maior o calibre mais facilmente se alcançam locais difíceis de aceder do que usando um instrumento de calibre reduzido, uma vez que se abrem os túbulos dentinários que conseqüentemente permitem uma maior e eficaz penetração de agentes antimicrobianos (Cohen e Hargreaves, 2007).

Quimicamente são usadas mais vulgarmente, não havendo consenso de qual a ideal, soluções como hipoclorito de sódio (NaOCl) e clorohexidina (CHX) (Estrela *et al.*, 2008).

3.2.1. Hipoclorito de sódio (NaOCl)

O hipoclorito de sódio é um solvente orgânico com larga atividade antimicrobiana, auxilia na lubrificação do canal e é também geralmente o irrigante mais usado.

O hipoclorito de sódio é uma base muito forte cujo pH é superior a 11 e atua degradando aminoácidos e causando hidrólises através da produção de moléculas de cloramina o que é determinante para justificar a sua grande capacidade antimicrobiana.

Clinicamente, é pouco tóxico quando empregado apenas no canal endodôntico contudo é muito tóxico se derramado nos tecidos periapicais.

É utilizado em concentrações que variam entre 0,5% e 6%, mas quando é utilizado em concentrações muito elevadas pode conduzir à redução da elasticidade da dentina, fragilizando-a.

Na clínica pedagógica de Medicina Dentária da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Fernando Pessoa este irrigante é usado numa concentração de 2,5%.

Apresenta capacidade para dissolver restos de tecidos orgânicos mas em contrapartida não dissolve a smear layer sendo necessária a aplicação de agentes quelantes para que estes a removam. O agente quelante mais utilizado é o EDTA, ácido dietilenodiaminotetraacético ou então ácido cítrico (Kamberi *et al.*, 2012; Iqbal, 2012; Karale *et al.*, 2011; Rossi-Fedele *et al.*, 2010).

Aquando da utilização de hipoclorito de sódio em bactérias *Enterococcus faecalis* os estudos revelam controvérsia, mas na sua maioria demonstram sensibilidade ao mesmo variando também as opiniões em relação á concentração ideal (Kamberi *et al.*, 2012; Iqbal, 2012; Karale *et al.*, 2011; Rossi-Fedele *et al.*, 2010).

3.2.2. Gluconato de clorohexidina

O gluconato de clorohexidina é uma bisbiguanida catiónica com função antisséptica.

A clorohexidina é uma molécula carregada positivamente que a pode tornar lipofílica ou hidrofílica o que lhe possibilita interagir com os fosfolípidos e lipopolissacarídeos das membranas celulares causando distúrbios ao longo da membrana celular permitindo a sua entrada na célula conduzindo a efeitos tóxicos a nível intracelular tais como coagulação do citoplasma.

É comercialmente designada de CHX e é aplicada em concentrações que variam entre 0,002 e 2%. Na clínica pedagógica de Medicina Dentária da FCS - Universidade Fernando Pessoa como irrigante é usada numa concentração de 2% enquanto que, como antisséptico é usada numa concentração de 0,20%. Apresenta função bacteriostática em concentrações mais baixas e função bactericida em concentrações mais elevadas. A sua principal vantagem baseia-se no largo espectro antimicrobiano que possui porque atua tanto em bactérias Gram positivo como em bactérias Gram negativo, possuindo uma atividade mais evidenciada em bactérias Gram positivo. Tem também capacidade de se libertar lentamente mantendo-se num nível estável de antimicrobiano no canal. A clorohexidina alcança múltiplos locais mesmo a nível celular reduzindo assim a probabilidade de resistência (Dornelles-Morgental *et al.*, 2011; Iqbal, 2012; Lee *et al.*, 2009; Karale *et al.*, 2011; Basrani *et al.*, 2007).

A principal desvantagem da clorohexidina é não remover o tecido orgânico o que também a torna menos tóxica para o tecido perirapical.

Se num tratamento se associa-se NaOCl com Clorohexidina teoricamente seria de esperar um efeito potenciado, uma vez que um dissolve a porção orgânica e o outro dissolve a porção inorgânica da smear layer, respetivamente. Mas em associação ocorre uma reação ácido base da qual resulta um precipitado que se pensa ser tóxico (Dornelles-Morgental *et al.*, 2011; Iqbal, 2012; Lee *et al.*, 2009; Karale *et al.*, 2011; Basrani *et al.*, 2007).

Segundo estudos realizados ambos os irrigantes diminuem a adesão de *Enterococcus faecalis* à dentina mas nenhum é totalmente eficaz na eliminação desta bactéria (Kishen *et al.*, 2008; Basrani *et al.*, 2007).

3.2.3. Hidróxido de cálcio

O hidróxido de cálcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) é também uma solução irrigante que atua intracanalmente por contato e apresenta capacidade de eliminação bacteriana mas somente quando utilizada por um período de sete dias (Paradella *et al.*, 2007).

Vários estudos demonstraram que o hidróxido de cálcio não apresenta capacidade de alcançar os túbulos dentinários onde geralmente se encontram alojadas as bactérias da espécie *Enterococcus faecalis* não exercendo assim a sua ação de contato direto e de difusão que necessita para realizar a sua ação antimicrobiana. Estudos apontam também que os principais motivos de resistência a esta solução por parte de *E. faecalis* será o fato de o hidróxido de cálcio na presença desta bactéria não manter o seu pH alcalino por um possível mecanismo ativo de bomba de prótons da bactéria que lhe fornece um meio adicional de manter o seu pH intracelularmente, bem como a sua capacidade de tamponamento do citoplasma. Apesar da bactéria em questão não apresentar capacidade de sobrevivência a um pH superior a 11,5 a dentina tem capacidade de tamponamento daí o meio dos túbulos dentinários nunca ser mantido a um pH suficientemente alcalino que permita a irradicação de *Enterococcus* (Lana *et al.*, 2009; Nacif e Alves, 2010; Paradella *et al.*, 2007; Stuart *et al.*, 2006).

3.2.4. Outras soluções antissépticas

○ O iodo foi inserido na endodontia por volta dos anos 80 pelo uso de iodo povidona, comercialmente conhecido por betadine®, visto que era um antisséptico que atuava numa ampla gama de microorganismos, apresentava baixa toxicidade, era hipoalergénico e não corava a dentina. Desde então foi amplamente utilizado. Hoje, estudos demonstram que o iodo pode inibir a matriz do colagénio da dentina bem como pode atacar proteínas, nucleótidos e ácidos gordos conduzindo à morte celular.

Tem como vantagem e a uma concentração de 2% ser menos irritante e menos tóxico que outras soluções utilizadas em endodontia como o formocresol (Iqbal, 2012).

○ O peróxido de hidrogénio (H₂O₂) é um gás líquido incolor que se degrada para formar água e oxigénio.

É ativo contra uma vasta gama de microorganismos pela produção de hidroxilos livres que atuam agredindo proteínas e DNA, cuja concentração pode variar entre 1 e 30% em aplicações endodônticas.

Em monoterapia e combinado com hipoclorito de sódio não apresenta grande efetividade na eliminação de *Enterococcus* mas quando combinado com clorohexidina formam um conjunto muito eficaz. Contudo, o peróxido de hidrogénio apresenta uma desvantagem que a afasta do uso continuado, o peróxido de hidrogénio forma efervescência o que o torna um perigo potencial pois pode infiltrar-se nos tecidos causando enfisema (Iqbal, 2012).

○ Promissoriamente, alguns estudos já apontam para uma combinação entre sais orgânicos como o cloreto e sódio e sorbato de potássio. Em monoterapia nenhum dos dois demonstrou qualquer eficácia mas quando combinados atuam sinergicamente eliminando biofilmes que possuem *Enterococcus faecalis*.

Daqui poderá surgir o primeiro passo para a desinfecção ideal e completa de infecções endodônticas causadas por *Enterococcus faecalis* (Van der Waal *et al.*, 2012a).

3.2.5. Antibioterapia

Vários antibióticos têm vindo a ser utilizados em endodontia muitas das vezes em forma profilática. Existem vários antibióticos que podem ser usados para tratar ou adjuvar a cavidade oral, como indica a tabela 3 (Ciancio, 1997).

Tabela 4: Antibióticos mais usados em Endodontia (Adaptado de Pinheiro, 2004 e Ciancio, 1997).

Antibiótico	Ação	
	Bacteriostático	Bactericida
Penicilina		✓
Amoxicilina		✓
Amoxicilina com ácido clavulânico		✓
Eritromicina	✓	
Tetraciclina	✓	
Cefalosporinas		✓
Clindamicina	✓	
Vancomicina		✓
Estreptomicina		✓
Gentamicina		✓

Dependendo das bactérias presentes eles são escolhidos de forma a terem um espectro de atuação mais alargado de forma a eliminar o maior número de patogénios possível. No caso de *Enterococcus faecalis* torna-se uma escolha ainda mais difícil, pois as resistências que possui são em grande número. Estudos demonstraram que esta bactéria é naturalmente resistente a cefalosporinas, a penicilinas, a clindamicina, carbapenemos, a quinolonas e ao trimetoprim. É também resistente à estreptomicina e gentamicina (Pinto *et al.*, 2011; Dahlén *et al.*, 2012).

Todavia, apresentam sensibilidade na presença de ampicilina, amoxicilina e vancomicina (Pinto *et al.*, 2011; Dahlén *et al.*, 2012).

Estas resistências desenvolvidas por esta bactéria podem conduzir a processos infecciosos e complicá-los. Um tratamento endodôntico mal realizado, sem eliminação completa desta bactéria pode levar a uma bacteriemia (Pinto *et al.*, 2011).

Surgiu também um novo irrigante que possui um antibiótico que desinfeta o canal e remove em simultâneo a smear layer, este denomina-se de BioPure MTAD e é uma

mistura de um isômero de tetraciclina (doxiciclina), ácido cítrico e detergente (Tween80). A doxiciclina presente possui grande afinidade para a dentina o que prolonga o efeito antibacteriano. Para além destas vantagens também é menos citotóxico que o hipoclorito de sódio, o EDTA e outros medicamentos endodônticos, embora também apresente algumas desvantagens tais como exibir coloração, causar sensibilidade e demonstrar resistência. Contudo, ainda não foi comprovada a eficácia de eliminação de *Enterococcus faecalis* por este produto (Kamberi *et al.*, 2012; Iqbal, 2012; Mohammadi e Shahriari, 2008).

3.2.6. Laser

O uso de laser tem hoje um grande impacto no tratamento em qualquer área de saúde, assumindo na endodontia um importante papel no que toca à irradiação microbiana pelo laser. Estudos têm vindo a demonstrar que é um potenciador de qualquer tratamento endodôntico convencional (Schoop *et al.*, 2004; Bergmans *et al.*, 2006).

Ao longo dos últimos anos têm sido realizados estudos, tanto a nível laboratorial como clínico de forma a testar os efeitos do laser como desinfectante, isoladamente e também como co-adjuvante dos sistemas convencionais de desinfeção em endodontia, com o objetivo de determinar a eficácia de desinfeção. Contudo, algumas questões têm sido levantadas aquando do uso de lasers de grande potência porque apesar de possuírem uma grande capacidade de eliminação microbiana, podem eventualmente apresentarem efeitos secundários relevantes para os tecidos dentinários. Sendo que as altas temperaturas que atingem podem causar lesões no periodonto, fusão do cimento, reabsorção radicular ou até mesmo necrose dos tecidos radiculares apicais (Bergmans *et al.*, 2008; Foschi *et al.*, 2007).

De forma a ultrapassar estas contrariedades, tem vindo a ser estudado um laser com potência inferior em associação com agentes fotosensibilizadores atóxicos, tratamento este que se denomina de terapia fotodinâmica (Garcez *et al.*, 2008).

Tem-se vindo a investigar em diversos estudos a efetividade do PDT (Terapia fotodinâmica) em infeções endodônticas causadas por *Enterococcus faecalis* como método de complementaridade de desinfeção (Fonseca *et al.*, 2008a).

A PDT consiste essencialmente num processo em que as moléculas do fotossensibilizador tem ação sobre um corante, geralmente o azul de metileno que é aplicado no alvo a tratar e que se liga à membrana das bactérias. Posteriormente, é irradiado um comprimento de onda específico e adequado que absorve o fotossensibilizante que leva à produção de oxigénio atómico, que exerce o seu efeito bactericida por rutura da parede celular nas bactérias residuais, que são todas aquelas que não foram eliminadas com o tratamento endodôntico padrão (Iqbal, 2012; Soukos *et al.*, 2006; Fonseca *et al.*, 2008a).

Em relação a este método ainda existem controvérsias quanto à sua efetividade no que concerne à eliminação de *Enterococcus* quando comparado com o irrigante hipoclorito de sódio (Iqbal, 2012; Bergmans *et al.*, 2008; Meire *et al.*, 2009; Soukos *et al.*, 2006; Fonseca *et al.*, 2008a).

Todavia, este método apresenta várias vantagens tais como não possuir toxicidade para o dente, o corante ser letal e até mesmo não existirem efeitos térmicos que possam causar danos nos tecidos que envolvem a raiz. Contudo, pode ser um tratamento extremamente caro (Iqbal, 2012).

II. Considerações finais

Dado à complexidade de mecanismos de virulência que a espécie *Enterococcus faecalis* possui, e em resposta a estes mecanismos têm-se verificado um aumento crescente da tentativa de encontrar métodos eficazes de eliminação desta bactéria, pois ela tem vindo a causar preocupação no que consiste ao fracasso de qualquer tratamento endodôntico, assumindo um papel crítico na infecção secundária ou re-infecção.

O sucesso do tratamento endodôntico está diretamente relacionado com a eliminação eficaz dos microorganismos do canal radicular. Assim, as soluções irrigantes são de tal ordem importantes que limpam o canal e lubrificam, removem os vestígios orgânicos e inorgânicos, promovem a dissolução do tecido e são antimicrobianos sem causarem danos no tecido periapical (Estrela *et al.*, 2008).

Por fim, será então de salientar que quanto maior a efetividade do tratamento primário endodôntico menor será a hipótese de re-infecção. Aquando de uma re-infecção, esta deverá ser tratada de uma forma tal minuciosa que não permita que qualquer género bacteriano patogénico se aloje nos canais radiculares podendo ter como consequência uma grave bacteriemia generalizada que pode conduzir à morte do utente portador de infecção endodôntica.

Novas alternativas terapêuticas continuam a ser pesquisadas com o objetivo de eliminar eficazmente esta espécie bacteriana.

III. Bibliografia

Aas, J. A., Paster, B. J., Stokes, L. N., *et al.* (2005). Defining the normal bacterial flora of the oral cavity, *Journal of Clinical Microbiology*, 43, pp. 5721-5732.

(2013). American association of endodontics. [Em linha]. Disponível em <<http://www.aae.org>> [Consultado em 23 de Junho de 2013].

Arana, A. T., Valle, J., Solano, C., *et al.* (2001). The Enterococcal surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation, *Applied and Environmental Microbiology*, 67, pp. 4538-4545.

Athanassiadis, B., Abbott, P. V. e Walsh, L. J. (2007). The use of calcium hydroxide, antibiotics and biocides as antimicrobial medicaments in endodontics, *Australian Dental Journal*, 52, pp. S64-82.

Baldassarri, L., Creti, R., Montanaro, L., *et al.* (2005). Pathogenesis of implant infections by enterococci *International Journal Artif Organs*, 28(11), pp. 1101-1109.

Basrani, B. R., Manek, S., Sodhi, R. N., *et al.* (2007). Interaction between sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate, *Journal of Endodontics*, 33, pp. 966-969.

Baumgardner, K. R. e Sulfaro, M. A. (2001). The anti-inflammatory effects of human recombinant copper-zinc superoxide dismutase on pulp inflammation, *Endodontics Journal*, 27, pp. 190-195.

Beer, R., Baumann, M. A. e Kielbassa, A. M. (2006). Estruturas normais e alterações patológicas. *Endodontia: texto e atlas*, São Paulo, Artmad, pp. 18-45.

Behlau, I. e Gilmore, M. S. (2010). Microbial biofilms in Ophtalmology and infectious disease, *Archives of Ophtalmology*, 126(11), pp. 1572-1581.

Bergmans, L., Moisiadis, P., Huybrechts, B., *et al.* (2008). Effect of photo-activated disinfection on endodontic pathogens *ex vivo*, *International Endodontic Journal*, 41, pp. 227-239.

Bergmans, L., Moisiadis, P., Teughels, W., *et al.* (2006). Bactericidal effect of Nd:YAG laser irradiation on some endodontic pathogens *ex vivo*, *International Endodontic Journal*, 39, pp. 547-557.

Camargo, I. L. B. C., Zanella, R. C., Gilmore, M. S., *et al.* (2008). Virulence factors in vancomycin-resistant and vancomycin-susceptible *Enterococcus faecalis* from Brazil *Brazilian Journal of Microbiology* 39, pp. 273-278.

Cetinkaya, Y., Falk, P. e Mayhall, C. G. (2000). Vancomycin-resistant Enterococci, *Clinical Microbiology Reviews*, 13, pp. 686-707.

Chai, W. L., Hamimah, H., Cheng, S. C., *et al.* (2007). Susceptibility of *Enterococcus faecalis* biofilm to antibiotics and calcium hydroxide, *Journal of Oral Science*, 49, pp. 161-166.

Ciancio, S. G. (1997). Antimicrobianos e Antibióticos. *In*: Nisengard, R. J. e Newman, G. M. (Eds.). *Microbiologia Oral e Imunologia*. 2ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, pp. 364-372.

Ciancio, S. G. e Nisengard, R. J. (1997). Controle e prevenção da doença periodontal. *In*: Nisengard, R. J. e Newman, M. G. (Eds.). *Microbiologia Oral e Imunologia*. 2ª ed. Rio de Janeiro Guanabara Koogan, pp. 331-335.

Cohen, S. e Hargreaves, K. M. (2007). *Caminhos da Polpa*. 9ª ed Rio de Janeiro, Elsevier, pp.

Costerton, J. W., Stewart, P. S. e Greenberg, E. P. (1999). Bacterial Biofilms: A common cause of persistent infections, *Science*, 284, pp. 1318-1322.

Dahlén, G., Blomqvist, S., Almstahl, A., *et al.* (2012). Virulence factors and antibiotic susceptibility in enterococci isolated from oral mucosal and deep infections, *Journal of Oral Microbiology*, 4, pp. 1-7.

Daves, C. P. (1996). Oral and upper respiratory tract flora. [Em linha]. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7627/>> [Consultado em 10/11/2012].

Davey, M. E. e O'Toole, G. A. (2000). Microbial Biofilms: from ecology to molecular genetics, *American Society for Microbiology*, 64(4), pp. 847-867.

Davis, W. L., Jacoby, B. H., Craig, K. R., *et al.* (1991). Copper-zinc superoxide dismutase activity in normal and inflamed human dental pulp tissue, *Endodontics Journal*, 17, pp. 316-318.

Diarra, M. S., Rempel, H., Champagne, J., *et al.* (2010). Distribution of antimicrobial resistance and virulence genes in *Enterococcus* spp. and characterization of isolates from broiler chickens, *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, pp. 8033-8043.

Dornelles-Morgental, R., Guerreiro-Tanomaru, J. M., Faria-Junior, N. B., *et al.* (2011). Antibacterial efficacy of endodontic irrigating solutions and their combinations in root canals contaminated with *Enterococcus faecalis*, *Oral Surgery Oral Medical Pathology Oral Radiology Endodontics*, 112, pp. 396-400.

Estrela, C., Silva, J. A., Alencar, A. H. G. d., *et al.* (2008). Efficacy of sodium hypochlorite and chlorhexidine against *Enterococcus faecalis* - A systematic review, *Journal application Oral Science*, 16, pp. 364-368.

Figún, M. E. e Garino, R. R. (2003). Sistema dental. In: Figún, M. E. e Garino, R. R. (Eds.). *Anatomia Odontológica Funcional e Aplicada*. Porto Alegre Artmed, pp. 208-380.

Fisher, K. e Phillips, C. (2009). The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*, *Microbiology*, 155, pp. 1749-1757.

Fonseca, M. B., Junior, P. O., Pallota, R. C., *et al.* (2008a). Photodynamic therapy for root canals infected with *Enterococcus faecalis*, *Photomedicine and Laser Surgery*, 26, pp. 209-213.

Fonseca, M. B., Junior, P. O., Pallota, R. C., *et al.* (2008b). Photodynamic therapy for root canals infected with *Enterococcus faecalis*, *Photomed Laser Surg*, 26, pp. 209-213.

Foschi, F., Fontana, C. R., Ruggiero, K., *et al.* (2007). Photodynamic inactivation of *Enterococcus faecalis* in dental root canals in vitro, *Lasers Surgery Medicine*, 39, pp. 782-787.

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

Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W. e Stoodley, P. (2004). Bacterial Biofilms: from the natural environment to infectious diseases, *Microbiology*, 2, pp. 95-108.

Hamilton-Miller, J. M. T. e Sah, S. (1999). Identification of clinically isolated vancomycin-resistant enterococci: comparison of API and BBL Crystal system, *journal of Medical Microbiology*, 48, pp. 695-696.

He, X., Hu, W., Kaplan, C. W., *et al.* (2012). Adherence to *streptococci* facilitates *fusobacterium nucleatum* integration into an oral microbial community, *Microbial Ecology*, 63(3), pp. 532-542.

Iqbal, A. (2012). Antimicrobial irrigants in the Endodontic therapy, *International Journal of Health Sciences*, 6, pp. 186-192.

Jett, B. D., Huycke, M. M. e Gilmore, M. S. (1994). Virulence of Enterococci, *Clinical Microbiology Reviews*, 7, pp. 462-478.

Jorge, A. O. C. (1998). Ecologia bucal. In: Jorge, A. O. C. (Ed.) *Microbiologia Bucal*. São Paulo, Livraria Santos Editora, pp. 1-19.

Jr., J. F. S. e Roças, I. N. (2004). Polymerase chain reaction-based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment, *Oral Surgery Oral Medical Pathology Oral Radiology Endodontics*, 97, pp. 85-94.

Jr., J. F. S. e Roças, I. N. (2008). Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures-review article, *Journal of Endodontics*, 34, pp. 1291-1301.

Jr., J. F. S. e Rôças, I. N. (2007). Bacterial pathogenesis and mediators in apical periodontitis, *Brazilian Dental Journal*, 18, pp. 267-280.

Junior, J. F. S., Rôças, I. N., Souto, R., *et al.* (2002). *Actinomyces* species, streptococci, and *enterococcus faecalis* in primary root canal infections, *Journal of Endodontics* 28, pp. 168-172.

Kamberi, B., Bajrami, D., Stavileci, M., *et al.* (2012). The antibacterial efficacy of Biopure MTAD in root canal contaminated with *Enterococcus faecalis*, *ISRN Dentistry*, 2012, pp. 1-5.

Karale, R., Thakore, A. e Shetty, V. (2011). An evaluation of antibacterial efficacy of 3% sodium hypochlorite, high-frequency alternating current and 2%chlorhexidine on *Enterococcus faecalis*: An in vitro study, *Journal of conservative dentistry*, 14, pp. 2-5.

Kayaoglu, G. e Orstavik, D. (2004). Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: Relationship to endodontic disease, *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 15(5), pp. 308-320.

Kishen, A., Sum, C. P., Mathew, S., *et al.* (2008). Influence of irrigation regimens on the adherence of *Enterococcus faecalis* to root canal dentin, *Journal of Endodontics*, 34, pp. 850-854.

Lana, P. E. P., Scelza, M. F. Z., Silva, L. E., *et al.* (2009). Antimicrobial activity of calcium hydroxide pastes on *Enterococcus faecalis* cultivated in root canal systems, *Brazilian Dental Journal*, 20, pp. 32-36.

Laplace, J.-M., Thuault, M., Hartke, A., *et al.* (1996). Sodium hypochlorite stress in *Enterococcus faecalis*: influence of antecedent growth conditions and induced proteins, *Current Microbiology*, 34(1997), pp. 284-289.

Lee, J. K., Baik, J. E., Yun, C. H., *et al.* (2009). Chlorhexidine gluconate attenuates the ability of lipoteichoic acid from *Enterococcus faecalis* to stimulate toll-like receptor 2, *Journal of Endodontics*, 35, pp. 212-215.

Lee, W., Lim, S., Son, H. H., *et al.* (2004). Sonicated extract of *Enterococcus faecalis* induces irreversible cell cycle arrest in phytohemagglutinin-activated human lymphocytes *Journal of Endodontics*, 30, pp. 209-212.

Liassine, N., Frei, R., Jan, I., *et al.* (1998). Characterization of Glycopeptide-Resistant *Enterococci* from Swiss Hospital, *Journal of Clinical Microbiology*, 36, pp. 1853-1858.

Loesche, W. J. (1997). Ecologia da flora oral. In: Nisengard, R. J. e Newman, M. G. (Eds.). *Microbiologia Oral e Imunologia*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, pp. 265-274.

M.Love, R., Mcmillan, M. D. e Jenkinson, H. F. (1997). Invasion of dentinal tubules by oral *Streptococci* is associated with collagen recognition mediated by the antigen I/II family of polypeptides, *Infection and Immunity*, 65, pp. 5157-5164.

Meire, M. A., Prijck, K. d., Coenye, T., *et al.* (2009). Effectiveness of different laser systems to kill *Enterococcus faecalis* in aqueous suspension and in an infected tooth model, *International Endodontic Journal*, 42, pp. 351-359.

Menezes-Silva, R., Khaliq, S., Deeley, K., *et al.* (2012). Genetic susceptibility to periapical disease: conditional contribution of MMP2 and MMP3 genes to the development of periapical lesions and healing response, *endodontic journal*, 38, pp. 604-607.

Mohammadi, Z. e Shahriari, S. (2008). Residual antibacterial activity of chlorhexidine and MTDA in human root dentin *in vitro*, *Journal of Oral Science*, 50, pp. 63-67.

Murray, B. E. (1990). The life and times of the Enterococcus, *Clinical Microbiology Reviews*, 3, pp. 46-65.

Nacif, M. C. A. M. e Alves, F. R. F. (2010). *Enterococcus faecalis* na endodontia: um desafio ao sucesso, *Revista Brasileira Odontologia*, 67, pp. 209-214.

Narayanan, L. L. e Vaishnavi, C. (2010). Endodontic microbiology, *Journal of conservative dentistry*, 13, pp. 233-239.

Paradella, T. C., Koga-ito, C. Y. e Jorge, A. O. C. (2007). *Enterococcus faecalis*: considerações clínicas e microbiológicas, *Revista de Odontologia da UNESP*, 36, pp. 163-168.

Peciuliene, V., Maneliene, R., Balcikonyte, E., *et al.* (2008). Microorganisms in root canal infections: a review, *Baltic Dental and Maxillofacial Journal*, 10, pp. 4-9.

Pinto, W. A., Filho, E. P., Parreira, M. L. J., *et al.* (2011). Occurrence Study of *Enterococcus faecalis* in pulp infections and evaluation of sensitivity to antimicrobial, *Revista da Universidade Vale do Rio Verde* 9, pp. 273-280.

Portenier, I., Waltimo, T. M. T. e Haapasalo, M. (2003). *Enterococcus faecalis* - the root canal survivor and "star" in post - treatment disease, *Endodontic Topics*, 6, pp. 135-159.

Prakash, B., Veeregowda, B. M. e Krishnappa, G. (2003). Biofilms: a survival strategy of bacteria, *Current Science*, 85(9), pp. 1299-1306.

Putz, R. e Pabst, R. (2000). Cabeça e pescoço. In: Putz, R. e Pabst, R. (Eds.). *Atlas de Anatomia Humana Sobotta*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, pp. 30-163.

Roças, I. N., Jr., J. F. S. e Santos, K. R. (2004). Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases, *Journal of Endodontics*, 30, pp. 315-320.

Rossi-Fedele, G., Figueiredo, J. A., Steier, L., *et al.* (2010). Evaluation of the antimicrobial effects of super-oxidized water (Sterilox) and sodium hypochlorite against *Enterococcus faecalis* in a bovine root canal model, *Journal application Oral Science*, 18, pp. 498-502.

Samaranayake, L. P. (1996). Normal oral flora. In: Samaranayake, L. P. (Ed.) *Essential Microbiology for Dentistry*. Churchill livingstone, pp. 263-266.

Schaudinn, C., Carr, G., Gorur, A., *et al.* (2009). Imaging of endodontic biofilms by combined microscopy (FISH/cLSM-SEM), *Journal of microbiology*, 235(2), pp. 124-127.

Schoop, U., Kluger, W., Nedjelic, A., *et al.* (2004). Bactericidal effect of different laser systems in the deep layers of dentin, *Lasers Surgery Medicine*, 35, pp. 111-116.

Seeley, R. R., Stephens, T. D. e Tate, P. (2005). Aparelho digestivo. In: Seeley, R. R., *et al.* (Eds.). *Anatomia e Fisiologia*. Lusociência, pp. 874-887.

Silva, J., Rodríguez, Y., Araya, J., *et al.* (2013). Detección de genes de virulencia en cepas de *Enterococcus faecalis* susceptibles y resistentes a aminoglicósidos *Revista Chilena Infectologia*, 30, pp. 17-22.

Soukos, N. S., Chen, P. S., Morris, J. T., *et al.* (2006). Photodynamic therapy for endodontic disinfection, *Journal Endodontics*, 32, pp. 979-984.

Sreeja, S., Babu, P. R. S. e Prathab, A. G. (2012). The prevalence and the characterization of the enterococcus species from various clinical samples in a tertiary care hospital, *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 6(9), pp. 1486-1488.

Stuart, C. H., Schwartz, S. A., Beeson, T. J., *et al.* (2006). Enterococcus faecalis: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment, *Journal of Endodontics*, 32, pp. 93-98.

Tortora, G. J. (2001). O sistema digestório. In: Tortora, G. J. (Ed.) *Corpo Humano Fundamentos de Anatomia e Fisiologia*. Porto Alegre, Artmed, pp. 432-461.

Tulunoglu, O., Alacam, A., Bastug, M., *et al.* (1998). Superoxide dismutase activity in healthy and inflamed pulp tissues of permanent teeth in children, *Journal Clinical pediatrics dental*, 22, pp. 341-345.

Van der Waal, S. V., Jiang, L. M., De Soet, J. J., *et al.* (2012a). Sodium chloride and potassium sorbate: a synergistic combination against Enterococcus faecalis biofilms: an in vitro study, *European Journal Oral Science*, 120, pp. 452-457.

Van der Waal, S. V., Jiang, L. M., De Soet, J. J., *et al.* (2012b). Sodium chloride and potassium sorbate: a synergistic combination against Enterococcus faecalis biofilms: an in vitro study, *Eur J Oral Sci*, 120, pp. 452-457.

Verneuil, N., Maze, A., Sanguinetti, M., *et al.* (2006). Implication of (Mn)superoxide dismutase of Enterococcus faecalis in oxidative stress responses and survival inside macrophages, *Microbiology*, 152, pp. 2579-2589.

Waters, C. M. e Dunny, G. M. (2001). Analysis of functional domains of the *Enterococcus faecalis* pheromone-induced surface protein aggregation substance, *Journal of Bacteriology*, 183, pp. 5659-5667.