

MICHELLE BERNARDES FONSECA

**TERAPIA FOTODINÂMICA APLICADA *IN VITRO* EM
CANAIS RADICULARES CONTAMINADOS COM
*Enterococcus faecalis***

SÃO PAULO

2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

MICHELLE BERNARDES FONSECA

**TERAPIA FOTODINÂMICA APLICADA *IN VITRO* EM CANAIS
RADICULARES CONTAMINADOS COM *Enterococcus faecalis***

Dissertação apresentada a Pós-graduação em
Ciências da Saúde do Hospital Heliópolis - HOSPHEL,
como requisito à obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Odilon Victor Porto Denardin

Co-orientador: Prof. Dr. Raul Capp Pallota

SÃO PAULO

2006

Fonseca, Michelle Bernardes

Terapia fotodinâmica aplicada *in vitro* em canais radiculares contaminados com *Enterococcus faecalis*. / Michelle Bernardes

Fonseca --São Paulo, 2006.

xvii, 65f.

Dissertação (Mestrado) Ciências da Saúde do Hospital Heliópolis

Título em inglês: Photodynamic therapy applied *in vitro* to radicular canals contaminated with *Enterococcus faecalis*.

1. Endodontia. 2. Fotoquimioterapia. 3. *Enterococcus faecalis*.
4. Cavidade da polpa dentária. 5. Terapia a laser de baixa intensidade.

Dedicatória

“Se enxerguei mais longe é porque me apoiei nos ombros de gigantes”

(Isaac Newton)

Prof. Dr. Manoel Eduardo de Lima Machado, Prof. Dr. Odilon Victor Porto Denardin, Prof. Dr. Raul Capp Pallota, Profa. Dra. Maria Letícia Borges Britto, Profa. Ana Lucia Franco Ricardo, Prof. Dr. Walter Genovese, Dr. João Francisco Veronezi , são os gigantes que cederam seus ombros para mim, agradeço sinceramente.

Dedicatória

“Não importa saber se a gente acredita em Deus: o importante é saber se Deus acredita na gente.” (Mario Quintana)

Meu **Deus**, sem ti o trabalho incessante e a vontade de evoluir não teriam sentido algum...Tu és sentido em minha vida, obrigada!

Meu amor, **Paulo**, você é a peça chave em todas as realizações da minha vida.

Rita de Cássia, minha mãe e base de tudo, você é meu porto seguro, prova viva de que o ser humano não tem limites, basta querer. Meu esforço está na imensa vontade de alcançar vitórias, como você alcançou!

João Fonseca, meu querido pai, obrigada pelas noites que ficou sem dormir naquela época em eu era menor que você, e pelo conforto que me deu nesses momentos.

Rachel, minha irmã, estarei contigo sempre que precisar.

Rosa, minha babá e amiga, eu te agradeço pela grande participação em minha vida desde o início, quando minha mãe precisava me deixar para cumprir sua jornada de trabalho., por tudo.

Aos meus sogros, **Berta e Paulo**, queridos como meus próprios pais, ofereço meu amor para sempre. Ao meu cunhado Renato, o carinho de um irmão.

Agradecimentos

“A eternidade está nas mãos de todos nós.

Viva de maneira que quando você se for,

muito de você ainda fique naqueles que

tiveram a boa ventura de te encontrar.” (Omar Khayam)

Meus sinceros agradecimentos:

Ao meu orientador: **Prof. Dr. Odilon Victor Porto Denardin**, por sua paciência e orientação. Tu és pessoa digna de admiração por sua imensa sabedoria, e por saber compartilhá-la com todos nós, que tivemos a maravilhosa oportunidade de tê-lo como professor.

Ao meu co-orientador **Prof. Dr. Raul Capp Pallota**, que traçou os caminhos dessa pesquisa e que muito me ensinou.

Ao **Prof. Dr. Abrão Rapoport**, coordenador do curso, orientador, professor, incentivador e amigo

Aos Profs. do curso: **Prof. Dr. Sérgio Altino Franzi, Prof. Dr. Carlos N. Lehn, Prof. Dr. Marcos Brasilino de Carvalho, Prof. Dr. Jozias de Andrade Sobrinho, Prof. Dr. Ali Amar, Prof. Dr. José Francisco de Sales Chagas, Prof. Dr. Ricardo Pires de Souza, Prof. Dr. Ricardo Cúrcio, Prof. Dra. Kátia Nemer, Prof. Dra. Késia Diego Quintaes, Prof. Dra. Adriana Madeira Álvares da Silva, Prof. Dr. Clemente Augusto de Brito Pereira**, e a todos os professores que por aqui passaram e contribuíram em mais essa etapa da minha vida.

A todos os colegas do curso que passaram ou estão passando pela pós-graduação e que, assim como eu, batalham para a realização desse sonho.

À **Eliane e Marcos** do Comitê de Ética, meu carinho por terem me ajudado tanto.

Rosi, meu muito obrigado pela força que deu para conclusão dessa etapa.

Selma, companheira de boas risadas, agradeço o apoio.

Maria, Luciana, Amélia, Nilza e Adenilda meu carinho eterno, pois vocês são maravilhosas e estarão para sempre em meu coração.

Jacira e Mércia, responsáveis por todo processo laboratorial do trabalho, vocês foram participantes fundamentais para a realização dessa pesquisa. Minha gratidão imensa pelos ensinamentos e amizade.

Dr. Heli, “se todos fossem iguais a você...”, que maravilha seria o relacionamento entre as pessoas. Obrigada por ter sido tão prestativo; você é uma pessoa especial.

E a todos os funcionários do complexo hospitalar Heliópolis, que não conheci pessoalmente, mas que cumprem o seu papel com dignidade e competência, e de uma forma indireta também contribuíram para a conclusão desse trabalho.

Profa. Ana Lucia Franco Ricardo, grande amiga que contagia com sua alegria de viver, foi companheira incansável e sempre acreditou na realização desse projeto. Contribuiu para minha formação profissional e continua dando exemplos de simpatia e de ética. Tenho muito que aprender com você, obrigada.

Prof. Luiz Antônio de Souza Merli, se tornou grande amigo e muito me ensinou.

Prof. Dr. Walter Genovese, obrigada pelo apoio a esse trabalho. Pessoa respeitável e tão acessível, surpreende pela atenção que presta aos alunos.

Prof. Dr. Manoel Eduardo de Lima Machado, grande Mestre, foi quem apresentou os primeiros encantos da Endodontia, minha especialidade. Obrigada pela inspiração que me trouxe até aqui.

Profa Dra. Maria Leticia Borges Britto, pelos ensinamentos e apoio inicial na carreira acadêmica, agradeço muito.

Aos prezados pacientes que efetuaram a doação dos dentes, obrigada por esse ato importantíssimo para o engrandecimento da nossa profissão.

A minha secretária **Alessandra**, amiga além de tudo, obrigada pela dedicação e paciência de todos esses anos.

A **Dra. Mitiko**, obrigada por sua participação na coleta das amostras.

Ao **Dr. Federico Foschi**, professor renomado em Boston, obrigada por me fornecer explicações fundamentais para a realização desse projeto.

A **Sonia Strong**, agradeço pela tradução de meu resumo.

A amiga **Vanessa Ivanovski**, por todo apoio e colaboração na reta final deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELA E FIGURAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
RESUMO	xii
ABSTRACT.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVO.....	4
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	6
3.1. Polpa dental e contaminação.....	8
3.2. Componentes da Terapia fotodinâmica.....	15
3.2.1. Luz.....	15
3.2.2. Fotossensibilizadores.....	18
3.2.3. Oxigênio.....	19
3.3.Terapia fotodinâmica aplicada na redução bacteriana.....	20
3.3.1. Mecanismo de ação.....	26
4. MATERIAL E MÉTODO.....	29
4.1. Material.....	30
4.2. Protocolo de contaminação dos canais radiculares.....	32
4.3. Protocolo de aplicação da Terapia fotodinâmica.....	33
4.4. Análise estatística.....	38
5. RESULTADOS.....	39
6.DISCOSSÃO.....	42
7.CONCLUSÃO.....	51
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
9.ANEXOS.....	63

LISTA DE TABELA E FIGURAS

Lista de Tabela

Tabela 1 - Distribuição da contagem de colônias de <i>Enterococcus faecalis</i> em canais radiculares de dentes contaminados nos grupos de estudo.....	40
--	----

Lista de Figuras

Figura 1 - Câmaras úmidas desenvolvidas pelo autor.....	32
Figura 2 - Canal radicular recebendo o azul de toluidina 0,0125%.....	33
Figura 3 - Fibra óptica do laser posicionada dentro do canal radicular.....	34
Figura 4 - Cone de papel absorvente calibre 50 introduzido durante 20 segundos dentro do canal radicular.....	35
Figura 5 - Cone absorvente sendo mergulhado em tubo de cultura contendo 10mL de solução salina.....	35
Figura 6 - Diluições realizadas em 1:10, 1:100 e 1:1000 das coletas realizadas antes e após a TFD.....	36
Figura 7 - Painel para identificação de microorganismos Gram-positivos.....	37
Figura 8 - Placas contendo meio de cultura e unidades formadoras de colônia (UFC), desenvolvidas a partir de coletas realizadas antes e após a aplicação da TFD (exemplo da amostra 10 do grupo teste)	41

LISTA DE ABREVIATURAS

AsGaAl	Arseneto de Gálio e Alumínio
AsGa	Arseneto de Gálio
ATCC	Cepa padrão derivado de culturas originais
ATPase	Enzima capaz de catalisar a clivagem de ATP
BHI	Brain Heart Infusion
cm	Centímetro
CRT	Comprimento real de trabalho
°C	Graus Celsius
DE	Densidade de energia
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Densidade de potência
EDTA	Solução de ácido etilenodiaminotetracético
FS	Fotossensibilizadores
GC	Grupo controle
GT	Grupo teste
h	Horas
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
He-Ne	Hélio - Neônio
HILT	High Intensity Laser Therapy
IGaAlP	Fosfeto de Índio Gálio Alumínio
J/cm ²	Joules por centímetro quadrado
LILT	Low Intensity Laser Therapy
Líquido de Dakin	Solução de hipoclorito de sódio a 0,5%
mW	MiliWatts
mW/cm ²	MiliWatts por centímetro quadrado
nm	Nanômetro
mm	Milímetro

mL	Mililitro
NaOCl	Hipoclorito de sódio
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
$^1\text{O}_2$	Oxigênio singlete
OH	Radical hidroxila
pH	Medida de acidez ou alcalinidade de uma solução
PQC	Preparo químico cirúrgico
RNA	Ácido ribonucléico
seg	Segundos
smear layer	Magma dentinário
t/cm^2	Tempo por centímetro quadrado
TBO	Azul de Toluidina
TFD	Terapia Fotodinâmica
UFC	Unidades formadoras de colônia
UVB	Raio ultravioleta B
W/cm^2	Watts por centímetro quadrado
W	Watts
λ	Comprimento de onda
$\mu\text{g}/\text{mL}$	Micrograma por mililitro
μL	Microlitro
μM	Micro mol
μm	Micrômetro

Resumo

Introdução: na busca de uma terapia capaz de atuar em bactérias resistentes ao tratamento endodôntico convencional, a Terapia Fotodinâmica é o processo em que uma radiação emitida a partir de um laser de baixa intensidade atua sobre um corante aplicado no organismo alvo, resultando em um efeito letal da célula, incluindo a bacteriana. **Objetivo:** o objetivo deste trabalho foi aplicar a Terapia Fotodinâmica *in vitro* e avaliar a redução das colônias de *Enterococcus faecalis* em canais de dentes humanos extraídos. **Material e métodos:** devidamente acessados e instrumentados, quarenta e seis dentes unirradiculares tiveram seus canais contaminados com *Enterococcus faecalis* em meio BHI e incubados por 48 horas a 35°C. Passado esse período, os dentes foram divididos aleatoriamente em dois grupos iguais, sendo um, grupo controle (GC), e outro, grupo teste (GT). Os vinte e três dentes do GC não receberam nenhum tipo de intervenção, enquanto os demais do GT receberam uma solução de azul de toluidina 0,0125% por 5 minutos, e, na sequência, foram irradiados com um laser de diodo (AsGaAl), potência de 50 mW e comprimento de onda de 660 nm. Foram realizadas duas coletas do material, para semeadura e cultura de bactérias, sendo uma antes e outra após o procedimento. Foi realizada a contagem de Unidades Formadoras de Colônias. **Resultados:** no GT houve uma redução de 99,9% na contagem de UFC enquanto o GC houve um incremento de 2,6% na contagem de UFC. **Conclusão:** a Terapia Fotodinâmica mostrou-se viável como agente bactericida no modelo de dente contaminado com *Enterococcus faecalis*.

Palavras-chave: Endodontia, Fotoquimioterapia, *Enterococcus faecalis*, Cavidade da polpa dentária, Terapia a laser de baixa intensidade.

Abstract

Introduction: in search of a therapy capable of acting on bacteria resistant to the conventional endodontic treatment, the photodynamic therapy is a process in which radiation emitted by a low-intensity laser acts on a dye applied to the target organism, resulting in a lethal effect for the cell, including the bacteria.

Objectives: the aim of this study was to apply the Photodynamic Therapy in vitro and evaluate the decrease in number of colonies of *Enterococcus faecalis*

in canals of extracted human teeth. **Methods:** forty-six uniradicular teeth, adequately accessed and instrumented, have had their canals contaminated with bacteria in BHI medium and had been incubated for 48 hr at 35°C. After that, the teeth had been randomly divided in two similar groups, a control (CG) and a test (TG) group. The 24 teeth from the CG did not undergo any type of intervention, whereas the TG teeth received a 0.0125% toluidine blue solution for 5 minutes and were subsequently irradiated with a 50-mW diode laser (AsGaAl) with at a wavelength of 660 nm. Material was collected twice, before and after the procedure, when the Colony Forming Units were counted.

Results: the mean decrease in colony forming units was 99,9% in test group while in control group was observed an increase of 2,6%. **Conclusion:** photodynamic therapy was effective as bactericidal agent in *Enterococcus faecalis* contaminated root canals.

Key words: Endodontics, Photochemical Therapy, *Enterococcus faecalis*, Dental Pulp Cavity, Laser Therapy, Low-Level.

1.Introdução

A terapia endodôntica tem aumentado significativamente seu êxito com o avanço de técnicas e emprego de novas tecnologias. As constatações clínicas aliadas ao conhecimento da literatura esclarecem que o insucesso pode ser justificado por falhas no processo de limpeza e desinfecção, o que irá perpetuar a permanência de microorganismos no sistema de canais radiculares, na massa dentinária e, algumas vezes, na face externa do ápice radicular, impedindo a cura. (Cheung 1996, Siqueira Jr. 2001).

Até que a câmara anaeróbia passasse a ser utilizada nos anos 70, acreditava-se que os microorganismos aeróbios e facultativos fossem predominantes em canais radiculares infectados (Leonardo e Leal 1998). Hoje as bactérias anaeróbias são isoladas em 60 a 90% dos casos de canais sintomáticos sendo que as mesmas invadem o sistema quando há comprometimento, no suprimento sanguíneo ou quando já ocorreu uma infecção por bactérias aeróbias, gerando um meio com baixo potencial de oxigênio. (Albuquerque *et al.* 1999)

A terapia endodôntica visa a descontaminação dos canais radiculares, a qual pode ser dificultada pelo alojamento dos microorganismos em canais acessórios, reentrâncias, istmos, deltas apicais e túbulos dentinários, regiões que, de certo modo, os protegem da remoção mecânica e das substâncias usadas no preparo químico-cirúrgico.

Uma das bactérias mais comumente associadas aos insucessos endodônticos é o *Enterococcus faecalis* (Sundqvist *et al.* 1998), por vezes resistente à terapia convencional e capaz de sobreviver sem nutrientes durante

longos períodos de tempo. Soma-se a isso a possibilidade deste microorganismo infectar a dentina em profundidade (Siqueira Jr *et al.* 1996) estabelecendo uma necessidade de complementação do preparo químico-cirúrgico por drogas que aumentem a ação antibacteriana e permitam um maior contato entre o agente descontaminante e o meio.

A terapia fotodinâmica, fundamentada na associação de drogas fotossensibilizadoras e luz no espectro visível ou infravermelho tem despertado o interesse de muitos estudiosos. Inicialmente descrita para promover ação letal sobre células do câncer, recentemente tem sido empregada na odontologia para promover efeitos letais sobre microorganismos (Ferreira 2003).

A radiação laser ativa um corante depositado no alvo e o sensibiliza de duas formas distintas: por meio de sistema redox, promovendo, após interação com o meio, uma resposta citotóxica que gera radicais livres e morte celular, ou por meio da liberação de energia, transformando o oxigênio molecular em oxigênio singlete, citotóxico para os microorganismos. (Gonçalves 2005)

Pouco se conhece a respeito do comportamento da terapia fotodinâmica no interior dos canais radiculares, assim sendo, este trabalho avalia a ação, *in vitro*, da luz laser associada a um corante fotossensível sobre cepas de *E. faecalis* no intuito da Terapia Fotodinâmica se tornar coadjuvante ao tratamento endodôntico na descontaminação dos canais radiculares.

2. Objetivo

O objetivo desse estudo foi avaliar *in vitro*, a eficiência bactericida da Terapia Fotodinâmica (laser AsGaAl associado ao corante azul de toluidina 0,0125%) aplicada em condutos de dentes humanos extraídos, contaminados com *Enterococcus faecalis*.

3. Revisão de literatura

Em sua maior parte a terapia endodôntica está relacionada com a eliminação e prevenção de infecção bacteriana da polpa e tecidos periapicais, no entanto, em alguns casos essa terapia não é suficiente e microorganismos podem sobreviver no interior dos canalículos dentinários. A permanência desses microorganismos não conduz necessariamente ao fracasso do tratamento, mas certamente, sua eliminação favorece o sucesso, visto que é evidente sua participação no desenvolvimento e manutenção de infecções no canal radicular e na região periapical (Estrela e Pécora 1997).

O primeiro relato sobre a presença de bactérias no interior dos canais radiculares foi descrito por Miller em 1894. Através de bacterioscopia do esfregaço de material coletado de canais radiculares infectados, foi possível detectar os três tipos morfológicos básicos de células bacterianas: cocos, bacilos e espirilos. O autor, não satisfeito, deduziu que muitas bactérias não foram passíveis de cultivo devido às técnicas disponíveis na época, muito limitantes (Miller apud Alves 2004).

Um grande problema relacionado com o aparecimento de infecções bacterianas é a formação do biofilme, primeiramente relatado por Zobell em 1943. Basicamente, o biofilme consiste de uma população microbiana existente dentro de uma matriz extracelular e, de um modo geral, essa população é formada de diversas espécies dependendo do meio em que está aderida, pois os metabólitos de uma espécie podem servir de nutriente para outra. (Habash e Reid 1999). O biofilme favorece as infecções recorrentes devido sua baixa susceptibilidade aos antimicrobianos (Foley e Gilbert 1997).

3.1. POLPA DENTAL E CONTAMINAÇÃO

A polpa dental é um tecido conjuntivo de origem mesodérmica, que preenche o interior do canal radicular e é composta de células, fibras, vasos sanguíneos, substância fundamental, vasos linfáticos e nervos. A situação anatômica de estar delimitada por todos os lados por paredes de dentina permite que, em condições normais, seja mantida sua esterilidade. No entanto, fatores físicos, químicos e até biológicos podem expor essa estrutura à contaminação microbiana (DeUzeda 2002).

As infecções endodônticas podem ser classificadas de acordo com o momento em que ocorrem. Logo após a necrose pulpar é instalada uma infecção primária, porém, microorganismos resistentes à terapia endodôntica ou que infectam o sistema de canais radiculares durante ou após a endodontia, geram as infecções persistentes e secundárias, respectivamente. Dentre cerca de 500 espécies que colonizam a cavidade bucal, um grupo restrito de 15 a 30 prevalece nas infecções endodônticas (Siqueira Jr. 2002)., sendo que a maioria dessas infecções pode ser considerada mista e polimicrobiana, predominando anaeróbios estritos. (Albuquerque *et al.* 1999).

Somente na década de 60 foi estabelecida de fato a relação causa-efeito entre bactérias e as patologias pulpares. Um trabalho expressivo foi o de Kakehashi *et al.* (1965), no qual os autores realizaram exposições cirúrgicas das polpas dentais de ratos estéreis (grupo teste) e de ratos com microbiota oral saprófita (grupo controle). O primeiro grupo apresentou necrose pulpar após o oitavo dia, com processo inflamatório crônico e formação de lesão

periapical, curiosamente, o segundo grupo não desenvolveu lesão periapical, mas sim, uma tentativa de reparação pulpar com formação de pontes de osteodentina após o 14º dia, demonstrando o potencial de reparação pulpar na ausência de infecção.

Shovelton (1964) estudou em 97 pacientes a presença e distribuição de microorganismos provenientes de processos cariosos ou traumáticos. Os resultados apontaram maior percentual de infecção na região cervical, quando comparados com os terços médio e apical da raiz.

Instalando-se a infecção, o tratamento endodôntico deverá ser executado levando em consideração cuidados cirúrgicos e químicos que não podem ser dissociados, pois a substância química será um complemento à fase mecânica da terapia, facilitando a ação do instrumento e aprofundando a limpeza para a intimidade dos canalículos.

Muitas substâncias foram desenvolvidas até então, no entanto, o hipoclorito de sódio é, desde sua descoberta, a mais utilizada na Endodontia atual, considerada excelente solvente orgânico e ainda promover a suspensão de raspas de dentina e magma dentinário, para sua posterior remoção. (Baumgartner e Cuenin 1992 e Goldman *et al.* 1982) .

Ayhan *et al.* (1999) verificaram a atividade antimicrobiana das soluções de hipoclorito de sódio 0,5% e 5,25%, gluconato de clorexidina 2%, álcool 21% e cresofeno sobre os microorganismos *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*. As suspensões de microrganismos foram ajustadas

previamente à escala 0,5 de *MacFarland* e inoculadas em placas com meio de cultura. Discos de papel filtro foram embebidos de 15µL de cada solução e colocados posteriormente sobre as placas inoculadas. Após o período de incubação (24 horas a 37°C), os halos inibitórios de crescimento bacteriano foram mensurados. A solução de hipoclorito de sódio 5,25%, foi efetiva contra todos os microrganismos indicadores, enquanto que o hipoclorito de sódio 0,5% apresentou menor eficácia. O álcool apresentou halos inibitórios menores que o evidenciado pela clorexidina, mas, sem significância estatística. O cresofeno foi a substância que apresentou os maiores halos de inibição, porém, trata-se de um produto citotóxico e portanto, impróprio para irrigação em endodontia.

O estudo de Silva e Antoniazzi (1999) mostrou que o uso associado do EDTA com o último instrumento do preparo químico-cirúrgico proporciona uma melhor limpeza dos canais radiculares independentemente da curvatura das raízes. O hipoclorito de sódio 0,5% e soro fisiológico não conseguiram remover o magma depositado nas mesmas, principalmente quando raízes curvas.

Vahdaty *et al.* (1993) testaram a eficiência de substâncias irrigantes utilizadas na desinfecção de canais radiculares bovinos. Grupos de 06 canais foram irrigados com 20 mL de cada solução durante 2 minutos: clorexidina a 0,2% e 2%, hipoclorito de sódio a 0,2% e 2% e soro fisiológico. A dentina dos canais foi removida em diferentes profundidades: 100, 300 e 500µm. Ambas concentrações de clorexidina e hipoclorito de sódio se mostraram igualmente efetivas na camada mais superficial, porém 50% das amostras ainda

apresentava algum grau de contaminação. As camadas mais profundas não foram descontaminadas por nenhum dos agentes.

Komorowski *et al.* (2000) realizaram estudo em dentes bovinos, os quais foram contaminados com *E. faecalis* e aplicaram hipoclorito de sódio 5,25% no interior dos canais durante um tempo de 5 e 15 minutos. Foi concluído que a solução não conseguiu penetrar em profundidade nos canalículos, impedindo o alcance a essas bactérias.

Sjogren *et al.* (1990) avaliaram 356 pacientes entre 8 e 10 anos após a intervenção endodôntica, sendo que, em dentes que não apresentavam radiolusência inicial, o sucesso alcançou 96%, contra 86% para os casos de polpa necrosada ou que apresentavam radiolusência apical.

Siqueira Jr. *et al.* (1998) estudaram o efeito antibacteriano de irrigantes endodônticos sobre bactérias anaeróbias Gram-negativas e bactérias facultativas, e relataram que o hipoclorito de sódio 4% mostrou ser o mais eficaz. Soluções de clorexidina (0,2% e 2%) também inibiram todas as bactérias, porém, em menor grau.

Siqueira Jr. *et al.* (2000) analisaram *in vitro* o efeito antimicrobiano de soluções de hipoclorito de sódio 1%, 2,5% e 5,25% sobre cepas de *E. faecalis*. Foram selecionados 40 dentes humanos unirradiculares extraídos, os quais tiveram o forame apical selado com resina epóxica para reduzir a possibilidade de contaminação da superfície radicular externa. O comprimento de trabalho de cada canal radicular situou-se 1 mm aquém do forame apical. Os canais radiculares instrumentados foram inoculados com uma suspensão de *E.*

faecalis e, posteriormente, irrigados com as soluções teste. Amostras de todos os canais foram colhidas antes e após a preparação. Na sequência, procedeu-se à diluição seriada e plaqueamento das amostras em Ágar *Mitis salivarius*, bem como a contagem das UFC (Unidades Formadoras de Colônia). Os resultados mostraram que todas as soluções testadas reduziram significativamente o número de células bacterianas no canal radicular.

Fabrizius *et al.* (1982) inocularam algumas cepas bacterianas em canais radiculares de macacos e após seis meses foi possível observar a grande capacidade do *Enterococcus faecalis* de sobreviver como microorganismo único, sem relação cooperativa com outras bactérias.

Molander *et al.* (1998) examinaram dentes com lesão periapical os quais foram submetidos ao tratamento endodôntico. A maioria dos dentes abrigava uma ou duas espécies bacterianas, com predominância das anaeróbias facultativas (69%). O gênero *Enterococcus* foi o mais encontrado apresentando crescimento intenso em 25 dos 32 casos (78%). Os autores afirmam que geralmente as bactérias anaeróbias facultativas são mais resistentes a atividade antimicrobiana do que as anaeróbias estritas, podendo persistir mais freqüentemente nos canais radiculares após terapia endodôntica. Esses microorganismos podem permanecer em fase latente, com baixa atividade metabólica até que seu crescimento seja ativado por mudança das condições ambientais como, por exemplo, uma infiltração coronária.

Bamman e Estrela (1999) relataram que espécies do gênero *Enterococcus* possuem resistência inerente aos agentes antimicrobianos, além de serem favorecidas pelas condições dos canais radiculares, podendo-se

estabelecer um processo infeccioso de difícil tratamento. Isso se deve a estrutura mais espessa da parede celular das bactérias Gram-positivas. São representantes desse gênero, em especial o *Enterococcus faecalis*, que possuem relação a casos de insucesso do tratamento endodôntico.

Hancock *et al.* (2001) estudaram a microbiota presente em 54 dentes tratados endodonticamente e que apresentavam lesões periapicais persistentes. Houve crescimento bacteriano em 34 casos, sendo que a microbiota era composta predominantemente por uma ou duas espécies de microorganismos Gram-positivos (80,4%). Os gêneros mais isolados foram *Enterococcus*, *Peptostreptococcus*, *Actinomyces* e *Streptococcus*. A *Candida albicans* foi isolada em 1 caso e o *E. faecalis* foi a mais isolada em 30% dos dentes infectados.

Figdor *et al.* (2003) demonstraram *in vitro* a capacidade do *Enterococcus faecalis* de suportar períodos prolongados de ausência de nutrientes. Os autores demonstraram a sobrevivência de um pequeno remanescente da população de *E. faecalis* em água durante 04 meses e em meios com limitação de nutrientes por mais de 04 meses. Após adição de substrato, essas bactérias foram capazes de retornar ao seu crescimento normal.

Peciulienė *et al.* (2000) investigaram a ocorrência de *Enterococcus faecalis* em 25 dentes tratados endodonticamente, assintomáticos, no entanto, com radiolusência periapical. Microorganismos foram detectados em 20 dentes sendo que o *E. faecalis* estava presente em 70% das culturas positivas, como único ou principal componente da microbiota.

Gomes *et al.* (2004) realizaram um estudo microbiológico em 60 canais radiculares tratados endodonticamente que ainda apresentavam lesão periapical. Associaram os casos de insucesso endodôntico a bactérias dos gêneros *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Peptostreptococcus* e *Fusobacterium*. *Enterococcus* (Gram-positivos anaeróbios facultativos) foram os microorganismos mais isolados.

Siqueira Jr. e Rôças (2004) realizaram um estudo com amostras colhidas em 22 dentes indicados para retratamento endodôntico sendo que todos apresentavam radiolusência periapical. A espécie mais encontrada foi o *Enterococcus faecalis*, em 77% dos casos. Os autores afirmam que, para um microorganismo colonizar canais com tratamento endodôntico prévio, ele deve resistir aos procedimentos antimicrobianos do tratamento inicial, e ainda suportar períodos de privações nutricionais no canal obturado.

Love (2001) demonstrou a capacidade do *Enterococcus faecalis* de invadir os túbulos dentinários, obtendo proteção contra o preparo químico-cirúrgico.

Orstavik e Haapasalo (1990) analisaram o grau de contaminação dos canalículos dentinários em amostras de dentina. As bactérias contaminantes eram *E. faecalis*, *S. sanguis*, *E. coli* e *P. aeruginosa*, sendo que, em dois dias o *E. faecalis* já havia infectado todo o comprimento dos canalículos dentinários enquanto que o *P. aeruginosa* raramente foi evidenciado, mesmo após 4 semanas. O *S. sanguis* precisou de até duas semanas para a total infecção e a

E. coli só penetrou após um prolongamento da incubação. Retirando-se os nutrientes, o *E. faecalis* resistiu por mais 10 dias enquanto que as outras bactérias morreram entre quatro e quarenta e oito horas.

De acordo com o trabalho de Marques (2004), a curva de crescimento do *E. faecalis* em amostras clínicas se dá ao longo de 36 horas, sendo que, no intervalo de 4 a 12 horas observa-se um crescimento exponencial das colônias, no intervalo de 12 a 24 horas, os valores praticamente não se alteram, indicando a fase estacionária, e, em 36 horas inicia-se um declínio da curva.

Pinheiro *et al.* (2003), isolaram 108 cepas de 60 canais radiculares indicados ao retratamento endodôntico. *Enterococcus faecalis* foi a espécie bacteriana mais freqüentemente isolada, presente em 27 (52,9%) dos 51 canais que apresentaram crescimento bacteriano, sendo que em 18 eram culturas puras. Na seqüência, 21 cepas de *E. faecalis* foram testadas quanto sua sensibilidade antimicrobiana. Todas as cepas foram sensíveis a benzilpenicilina, amoxicilina e amoxicilina + ácido clavulânico. A vancomicina e moxifloxacino também sensibilizaram todas as cepas, no entanto, 08 ainda resistiram a azitromicina, sendo que duas dessas também foram resistentes a eritromicina. Três cepas foram resistentes a tetraciclina e doxicilina e 1 amostra foi resistente a vários antibióticos: eritromicina, azitromicina, tetraciclina, doxicilina e cloranfenicol.

3.2. COMPONENTES DA TERAPIA FOTODINÂMICA

3.2.1. LUZ

Os estudos iniciais de Terapia Fotodinâmica utilizaram luz incandescente como fonte luminosa, no entanto, o fato dessas lâmpadas gerarem calor, não possuírem monocromaticidade e por serem difusas, limitavam os resultados. Com o desenvolvimento do laser de Rubi por Theodore Maiman, em 1960, foi disponibilizada uma nova opção terapêutica para a área médica (Wigdor *et al.* 1995).

A luz laser permite concentrar uma grande densidade de energia (fluência) no local irradiado e produz luz com comprimento de onda específico, melhorando os resultados. (Lima 2004)

O laser de Hélio-Neônio (He-Ne) com comprimento de onda de 632,8nm foi muito utilizado nas décadas de 70 e 80, mas tinha o inconveniente de ser um aparelho de grande porte e o fato de seu meio ativo estar contido por ampolas de vidro, com risco de se romperem (Almeida-Lopes 1999).

Com a tecnologia, os lasers de diodo foram desenvolvidos em aparelhos pequenos, de fácil transporte e manuseio, com baixa frequência de manutenção, além do custo reduzido.

Atualmente os lasers não cirúrgicos mais utilizados são os de diodo, com potência média de 30 a 100mW, modo de emissão contínuo ou pulsátil, e comprimentos de onda entre 630 e 904nm. Suas principais aplicações estão baseadas na quantidade de luz absorvida, e não na promoção de efeitos térmicos, como os lasers de alta potência. (Garcez *et al.* 2003)

A laserterapia consiste em promover eventos fotoquímicos e fotofísicos nas mitocôndrias (laser vermelho) e nas membranas citoplasmáticas (laser infravermelho). Algumas moléculas celulares fotorreceptoras são sensíveis a determinados comprimentos de onda, permitindo-as absorver fótons e desencadear reações metabólicas. Karu (1989)

Os lasers vermelho e infravermelho possuem fótons de baixa energia que não ionizam, causam somente excitação e pouco calor, diferentemente dos raios X e UVB, que estão no espectro abaixo do ultravioleta, e possuem fótons de alta energia capazes de ionizar átomos, e favorecer mutações (Tunèr e Hode, 1996)

A absorção seletiva do laser pelo tecido é determinada pelo seu comprimento de onda, portanto, para cada comprimento de teremos uma interação diferente entre o tecido e luz.(Almeida-Lopes 1999).

O laser de alta intensidade pode ser aplicado na desinfecção de canais radiculares, no entanto, Wilson *et al.* (1996) lhe atribui algumas desvantagens como: geração de calor, produção de gases tóxicos prejudiciais ao operador e destruição de tecidos vizinhos. No entanto, o laser de baixa intensidade só consegue ação bactericida se associado a um corante fotossensível (Wilson 1994).

São poucos os registros sobre o efeito letal dos lasers em baixa intensidade sobre microorganismos quando empregado isoladamente (König *et al.* 2000). Contudo, muitos estudos têm atestado o efeito destes lasers sobre a viabilidade microbiana quando os mesmos são

associados a drogas fotossensibilizadoras (Bhatti *et al.* 2002, Ferreira 2003).

De acordo com Genovese (2000), o laser de baixa intensidade na Endodontia tem aplicações na hipersensibilidade dentinária, favorecendo a liberação de beta endorfinas na polpa dental; na pulpite, com função antiinflamatória sobre os restos vitais da polpa; e na necrose pulpar, obtendo-se alívio da dor, redução da reação inflamatória periapical com paralização da coleção purulenta, redução da sensibilidade à percussão e bioestimulação das células da região periapical.

3.2.2. FOTOSSENSIBILIZADORES (FS)

A habilidade de um componente em absorver luz incidente não significa necessariamente que ele possa atuar como um fotossensibilizador. Para produzir efeito antimicrobiano, os fotossensibilizadores devem apresentar picos de absorção próximos ao comprimento de onda da luz utilizada e não devem apresentar toxicidade ao hospedeiro (Wilson *et al.* 1992).

Os principais corantes encontrados na literatura são os derivados da hematoporfirina, as fenotiazinas (azul de toluidina e azul de metileno), as cianinas (indocianina verde), os fitoterápicos (azuleno) e as ftalocianinas. (Garcez *et al.* 2003)

O azul de toluidina 1%, vem sendo usado na Estomatologia há mais de três décadas para evidenciação clínica de neoplasias malignas epiteliais. É um corante monocromático da família das tiasinas que apresenta grande afinidade pelo DNA dos núcleos celulares e pelo RNA citoplasmáticos.

Na década de 90, alguns estudos demonstraram que muitas bactérias da cavidade oral, incluindo as periodontopatogênicas, são susceptíveis ao azul de toluidina usado como agente fotossensibilizador da TFD (Wilson e Dobson 1992, Ferreira 2003).

3.2.3. OXIGÊNIO

A presença de oxigênio no local a ser tratado é fundamental para que a Terapia Fotodinâmica ocorra, já que os radicais tóxicos são formados a partir dele (Tomé 2002).

Foi nos anos setenta, quando cientistas passaram a pesquisar fontes endógenas e exógenas de radicais livres e seus alvos celulares preferenciais, que o oxigênio, conhecido até então como provedor de vida, teve desvendado seu papel na degeneração celular (Bechara 2002).

A ação fotodinâmica é uma das reações que o oxigênio pode estabelecer com substâncias orgânicas ou inorgânicas e acontece por absorção da energia eletrônica proveniente do fotossensibilizador. Isso o leva a um estado singlete, diamagnético, muito reativo e capaz de oxidar biomoléculas. As mitocôndrias parecem ser os principais sítios celulares

de formação de oxi-radicais, pois o oxigênio que escapa da redução à água na via respiratória (2-3%) se transforma em radicais livres, reagindo contra as próprias mitocôndrias e outras organelas, injuriando-as quimicamente. Outro sítio de formação é o retículo endoplasmático, onde o citocromo P-450 produz radicais derivados do oxigênio e os utiliza na detoxificação de drogas, uma atividade favorável dos oxi-radicais, embora eles não tenham especificidade para discriminar as estruturas celulares (Bechara 2002).

3.3. TERAPIA FOTODINÂMICA APLICADA NA REDUÇÃO BACTERIANA

O primeiro a relatar morte de células pela interação da luz foi Oscar Raab em 1900, um estudante de medicina que trabalhava com Professor Hermano Von Tappeiner em Munich. Pesquisando os efeitos do corante acridina em paramécios de malária, percebeu, em um dos experimentos, a diminuição drástica desses microorganismos. Seguiu o mesmo protocolo de experimentos anteriores, no entanto, o resultado surpreendera; o que lhe chamou a atenção foi lembrar que no momento dessa experiência, chovia muito e ocorreu um raio muito luminoso. Associando os acontecimentos, Raab descobre então a propriedade óptica da fluorescência e conclui que não era a luz, mas alguns produtos da fluorescência que induziam a toxicidade *in vitro* (Daniel e Hill 1991).

Von Tappeiner usou a pesquisa de Raab e, junto com o dermatologista Jesionek, publicou dados clínicos usando eosina como fotossensibilizador no tratamento do câncer de pele. Em 1904, Von Tappeiner e Jodlbauer descreveram que a presença do oxigênio era um requisito para a

fotossensibilização. Embora os resultados tenham sido positivos, esse trabalho não teve continuidade. Meyer-Betz, em 1913, verificou os efeitos da hiperfotossensibilidade da pele após a auto administração de hematoporfirina, o pesquisador teve edema severo e hiperpigmentação cutânea, persistindo por dois meses (Daniel e Hill 1991).

Dougherty *et al.* (1975) publicaram uma série de trabalhos realizados em ratos e foi a partir daí que a TFD passou a ser reconhecida como uma alternativa para o tratamento de câncer.

Esse tipo de tratamento induz a morte celular programada (apoptose) no tecido tumoral, no entanto, esse mecanismo ainda não está bem esclarecido. Muitos fotossensibilizadores possuem a mitocôndria como alvo principal através da liberação de citocromo c (fator de indução de apoptose) e certas pró-caspases. (Ribeiro *et al.* 2004).

As espécies reativas (oxigênio singlete e ânion-radical superóxido) geradas a partir da interação entre o estado excitado do corante e o oxigênio, e as resultantes dos processos secundários (radicais livres e outras espécies carregadas), iniciam uma cadeia de reações bioquímicas, danificando a célula tumoral em diferentes proporções. Os sítios ricos em elétrons, presentes nas células-alvo, tendem a ser os mais facilmente modificados, como, por exemplo, a guanina, cadeias laterais de aminoácidos contendo estruturas aromáticas e enxofre, ligações duplas de esteróides e lipídeos insaturados. Isso resulta em danos à parede celular, mitocôndria, e lisosomos, comprometendo a integridade celular. Nenhum efeito mutagênico sobre as células sadias foi

reportado até o momento, permitindo a repetição do tratamento em caso de recorrência ou mesmo de lesões estendidas. (Machado 2000)

Como a maioria das espécies bacterianas não apresenta componentes fotossensíveis, a utilização de um composto que atraia para si a luz e inicie a formação de radicais livres é fundamental (Wilson *et al.* 1992). Assim, células desprovidas de componentes fotossensíveis endógenos podem reverter o quadro tornando-se sensíveis a luz quando coradas com substâncias como o azul de metileno, azul de toluidina, eosina e hematoporfirinas (Wilson 1993).

Haas *et al.* (1997) realizaram um estudo *in vitro* para avaliar a efetividade da Terapia Fotodinâmica na eliminação de bactérias da superfície de discos de titânio com superfície polida. Estes discos foram contaminados com as *Porfiromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Actinobacilos actinomycetemcomitans*, e divididos em quatro grupos experimentais. Grupo 1 recebeu azul de toluidina na concentração de 100 µg/mL e, após 1 minuto foi irradiado com o laser diodo de 905 nm de comprimento de onda operando no modo pulsado, com potência de 7,3 mW por um período de 60 segundos. O grupo 2 não recebeu nenhum tipo de tratamento. Já o grupo 3 recebeu irrigação somente com soro fisiológico por 1 minuto e subsequente aplicação do laser com os mesmos parâmetros do grupo 1, e finalmente o grupo 4, que recebeu somente azul de toluidina. Imediatamente após os tratamentos foram coletadas amostras e realizados exames de cultura. O grupo 1 foi o único a apresentar culturas negativas indicando a provável eficácia dessa aplicação em casos de periimplantite. Nas superfícies tratadas apenas com azul de toluidina ou laser, os autores não observaram diminuição nas culturas bacterianas.

Silbert *et al.* (2000) testaram a Terapia Fotodinâmica quanto à sua capacidade de reduzir a contaminação bacteriana em canais radiculares. Instrumentadas e autoclavadas, raízes de dentes humanos foram divididas em dois grupos, onde o primeiro foi inoculado com uma suspensão de *Streptococcus mutans* e o segundo, com uma suspensão de *Enterococcus faecalis*. Conjugou-se o corante azul de metileno com uma fonte de laser de diodo de Fosfeto de Índio Gálio Alumínio (IGaAIP) de 670nm de comprimento de onda por períodos de 30 a 240 segundos. Concluiu-se que a TFD pode ser um efetivo método de redução bacteriana intracanal, porém parâmetros devem ser ajustados para se obter uma eliminação mais eficaz do *E. faecalis*.

Ferreira (2003), com objetivo de avaliar a ação letal promovida por um laser diodo semiconductor, por fotossensibilizadores e pela associação de ambos, utilizou culturas de *Actinomyces naeslundii*, *Prevotella denticola*, *Eubacterium sp*, bastonetes Gram-negativos e *Streptococcus sanguis* para esse experimento. As mesmas foram coradas com solução de azul de toluidina e azul de metileno na concentração de 50 µg/mL (0,5%), sendo que um grupo sofreu irradiação do laser por 60 segundos e outro grupo por 120 segundos, nos quais foram depositados uma densidade de energia de 150 J/cm² e 300 J/cm², respectivamente. Dois outros grupos receberam corante e laser isolados. Na seqüência, frações de 100 µL foram coletadas e mantidas em cultura de anaerobiose. A contagem das colônias possibilitou concluir que o uso isolado do laser de baixa intensidade ou de drogas fotossensibilizadoras, não promove alterações significativas na viabilidade de microorganismos bucais, no entanto, diferenças estatisticamente significantes foram evidentes

quando associados os dois componentes, com maiores reduções nas amostras coradas com azul de toluidina, não importando o tempo de exposição ao laser.

Com o objetivo de avaliar a eficácia do azul de metileno e do azul de toluidina na fotossensibilização letal de microorganismos patogênicos, Teichert *et al.* (2002) utilizaram estes corantes em diversas concentrações associados a um laser de Argônio ($\lambda=630$ nm) e um laser diodo ($\lambda=664$ nm) com fluência de energia variando entre 10 e 60 J/cm², e intensidade de potência variando de 50 a 100 mW/cm². As concentrações dos corantes foram: 10, 20, 30 40, 50, 100, 150 e 200 μ M e foram aplicadas em *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Hemophilus influenzae*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Os resultados obtidos pelos autores indicaram que todos os microorganismos foram eliminados em algum grau quando expostos ao laser na presença dos corantes. No entanto, a fotossensibilização dependeu do corante utilizado, sua concentração, fluência e intensidade de potência, bem como da espécie bacteriana envolvida.

Garcez (2002) avaliou o potencial de redução bacteriana intracanal de canais contaminados com *E. faecalis*. Foram usados 20 dentes extraídos divididos em dois grupos comparativos de hipoclorito de sódio 0,5% e de uma pasta composta de azuleno 25% e Endo-PTC. O segundo grupo foi irradiado por laser diodo com comprimento de onda de 685nm durante 5 minutos. A redução bacteriana foi de 100% no grupo laser.

Kömerik *et al.* (2002) avaliaram o efeito do laser diodo e do azul de toluidina em várias concentrações na mucosa de ratos e o poder de penetração do corante nesse tecido. As concentrações foram 25, 50 e 200 μ g/mL. A

mucosa recebeu 25 µL do corante e posterior aplicação do laser com uma fibra ótica de 6 mm de diâmetro; o lado oposto da mucosa foi tido como controle negativo. Os grupos experimentais se dividiram em: corante 25 µg/mL (0,25%) e laser durante 5 minutos com energia de 110 J/cm²; e corante 50 µg/mL (0,5%), laser durante 8 minutos com energia de 170 J/cm² e corante 200 µg/mL (2%) e laser isoladamente durante 16 minutos com energia de 340 J/cm². Os autores também avaliaram o efeito dos corantes aplicados isoladamente. Na análise histológica, não foi observado em nenhum grupo alterações nas fibras musculares, tecido conjuntivo e epitélio. Não ocorreram alterações nos vasos sanguíneos, necrose tecidual e não havia processo inflamatório presente. Na avaliação da distribuição do corante 200 µg/mL por 10 minutos presente no tecido epitelial e no tecido conjuntivo, os níveis se apresentaram baixos e compatíveis com os índices do lado controle. Notou-se que o tempo de aplicação do laser influenciou a penetração do corante no tecido, a mesma sendo, portanto, dose dependente. Em camadas mais profundas os autores não encontraram evidências do corante e permitiu confirmar que a aplicação dessa terapia seria para o tratamento de infecções superficiais. Os autores concluem o estudo afirmando que é seguro o uso tópico do azul de toluidina associado ao laser na cavidade oral para o tratamento de infecções tópicas localizadas.

Matevski *et al.* (2003) realizaram um estudo para avaliar se a presença do fluido gengival, sangue, saliva dentre outros poderiam influenciar na Terapia Fotodinâmica. A fotossensibilização letal foi analisada *in vitro* sobre cultura de bactérias periodontopatogênicas, *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Actinobacillus*

actinomycetemcomitans associadas ao sangue ou ao soro fisiológico para simular o fluido gengival. As fontes de luz utilizadas foram o laser de He-Ne ($\lambda = 635 \text{ nm}$) e a lâmpada de xenônio com filtro vermelho, a droga fotossensibilizadora foi o azul de toluidina nas concentrações de $12,5 \mu\text{mg/mL}$ e $50 \mu\text{mg/mL}$. Os autores puderam observar redução das bactérias em todas as aplicações, exceto *Bacteroides forsythus*, que apresentou crescimento quando utilizada a fonte de xenônio. Foi possível concluir que a Terapia Fotodinâmica pode ser afetada negativamente na presença de sangue e fluido gengival, pois estes podem refletir ou absorver a luz, atuando, desta forma, como uma barreira protetora às bactérias.

3.3.1. MECANISMO DE AÇÃO

A técnica de Terapia Fotodinâmica necessita de três ingredientes essenciais: um fotossensibilizador FS (molécula opticamente ativa), luz em frequência apropriada, substrato (oxigênio molecular).

O corante que absorve a luz inicia uma série de reações químicas que levam a produção direta ou indireta do oxigênio singleto, além de outras moléculas altamente reativas. Esse fenômeno ocorre quando o elétron excitado do fotossensibilizador altera seu estado de spin, levando-o de seu estado fundamental tripleto (T) para o estado singleto excitado (S). Atingido esse estado, a energia absorvida é transferida para outra molécula do meio e o fotossensibilizador retorna ao seu estado fundamental, livre para novo ciclo de absorção de luz. (Waidelich *et al.* 2003)

O caminho para essa “passagem” de energia do fotossensibilizador para o substrato pode ser percorrido através de duas reações, tipo I e tipo II. Em geral, a reação tipo I ocorre quando a concentração de oxigênio do meio é baixa, o que permite que a energia seja transferida para moléculas facilmente oxidáveis (aminas, fenóis, etc.) ou reduzíveis (quinonas). Essa interação levará a formação de radicais livres, como hidroxila (-OH) e peróxido ($-H_2O_2$), altamente reativos. (Freitas e Baronzio 1991).

Na reação tipo II a transferência da energia é direta para o oxigênio, gerando o oxigênio singleto, altamente reativo, (Roberts e Cairnduff 1995).

Ácidos nucléicos, enzimas, membranas celulares, mitocôndrias, lisossomos e núcleos, além de proteínas estruturais, são os maiores alvos biológicos dos radicais livres e do oxigênio singleto (1O_2) gerados. Deste modo, o próprio fotossensibilizador pode ser destruído. (Ochsner 1997).

A concentração do fotossensibilizador pode variar de acordo com a profundidade do tecido, isso devido o processo de autodestruição causado pela geração de oxigênio singleto. Quanto mais eficaz o fotossensibilizador empregado, maior a variação de sua concentração em relação a profundidade. (Stepp 2003)

Chan e Lai (2003) expuseram culturas de patógenos periodontais à radiação de dois lasers de baixa intensidade: laser de He-Ne (632nm) com 30 mW de potência e dois lasers de diodo ($\lambda = 665nm$ e $\lambda = 830nm$) ambos com 100mW, com ou sem aplicação de azul de metileno. Os

melhores resultados foram atribuídos ao laser de diodo, $\lambda = 665\text{nm}$, aplicado durante 60 segundos, o que gera densidade de energia de $21,2\text{ J/cm}^2$, na presença do fotossensibilizador. *Actinomyces actinomycetencomitans* e *Bacterium fusonucleatum* foram eliminadas em 95%, e *Porphiromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e *Streptococcus sanguis* foram eliminadas entre 99 e 100%.

Silbert *et al.* (2000) em um estudo *in vitro* com *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus mutans* intra canal, obtiveram redução de 100% para o *S. mutans* e de 40% para *E. faecalis* utilizando o corante azul de metileno 0,01% e laser de He-Ne por 4 minutos.

4. Material e Método

4.1. Material

Quarenta e seis dentes humanos unirradiculares extraídos com comprimento médio de 21mm foram recolhidos mediante termo de doação assinado por pacientes de clínica privada. O motivo das extrações foi por doença periodontal avançada, e foram usados dentes anteriores com alto grau de integridade, sem tratamento endodôntico prévio. A escolha de dentes naturais foi importante no que diz respeito à permeabilidade dos canalículos dentinários, que pode ser muito favorável para a manutenção da viabilidade bacteriana.

Os mesmos foram descontaminados com solução de hipoclorito de sódio 0,5% (Inodon®) e peróxido de hidrogênio 10 vol. (Niasi), antes da realização das cirurgias de acesso com broca esférica diamantada nº 2 ou nº 3 (Microdent Materiais Odontológicos). Os canais foram explorados com lima Kerr calibre 10 (Dentsply-Maillefer®, EUA) e o comprimento real de trabalho (CRT) foi estabelecido subtraindo-se 1mm no momento em que se observasse a lima no forame apical. Assim, estipulou-se o limite da instrumentação a um milímetro aquém do forame apical.

Os dentes foram instrumentados pela técnica cérvico-apical acorde Machado (1993) até lima Kerr calibre 50. Durante todo o processo de instrumentação, as limas foram intercaladas por irrigação de 3 mL de hipoclorito de sódio 0,5% (Inodon).

Concluído o preparo, todos os canais foram irrigados com um tubete de EDTA 17% (solução de ácido etilenodiaminotetracético) seguido de 10mL de hipoclorito de sódio 0,5% e secos com cones de papel absorvente estéril calibre 50. As raízes foram envolvidas por resina acrílica termoativada a fim de protegê-las de contaminação externa. (foto 1).

Um teste de esterilização foi realizado para que não houvesse dúvidas em relação ao método. Cinco dentes unirradiculares devidamente acessados e instrumentados, foram submetidos a autoclavagem a 121°C durante 15 min. (Autoclave Dabi Atlante®) envoltos em papel grau cirúrgico (Baumer®). Na seqüência seus canais receberam uma solução de BHI estéril, e, após 24 horas, esse material foi coletado com cone de papel absorvente estéril (Dentsply-Maillefer®, EUA) calibre 50 mantido durante 20 segundos dentro do canal. Semeado em placa de Petri com Ágar Bile Azida, não houve crescimento de Unidades Formadoras de Colônias, comprovando sua esterilização.

Dando seguimento ao experimento, os quarenta e seis dentes foram então autoclavados em embalagem de papel grau cirúrgico, a 121°C durante 15 min. e divididos em 2 grupos iguais de 23 dentes cada, denominados Grupo Controle (GC) e Grupo Teste (GT). Somente como forma de viabilizar a pesquisa, os dentes foram estudados em 05 grupos de 08 amostras contendo 04 representantes do GC e 04 representantes do GT; e 01 grupo de 06 amostras contendo 03 representantes do GC e 03 representantes do GT. Cada grupo foi trabalhado durante uma semana totalizando um período de 06 semanas para todas as amostras.

4.2. Protocolo de contaminação dos canais radiculares

Os canais radiculares foram preenchidos com 10 µL de suspensão de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 em meio BHI, através de pipeta automática, cedidos pelo Laboratório de Microbiologia do Hospital Heliópolis.

Posicionaram-se os dentes individualmente em câmaras úmidas semi tampadas desenvolvidas pelo autor (Figura 01), e incubados a 35°C seguindo as normas da NCCLS, por 48h para que os microorganismos penetrassem nos canalículos dentinários (Orstavik e Haaspasalo 1990).

Essa câmara foi produzida em potes de urina estéreis, forrados com gaze embebida em soro fisiológico também estéril.



Figura 01: Câmaras úmidas desenvolvidas pelo autor.

Decorrido esse período, a pesquisa foi realizada aos pares, 01 dente do GC e 01 dente do GT. A princípio, coletou-se uma amostra pré-terapia para que se conhecesse o número de colônias existentes antes do procedimento.

4.3. Protocolo de aplicação da Terapia Fotodinâmica

Com o auxílio de seringas para insulina os canais foram preenchidos por uma solução aquosa de azul de toluidina 0,0125% (Farmácia Fórmula e Ação).

As pontas das cânulas de injeção foram introduzidas até próximo ao preparo apical e o corante, ejetado lentamente, milímetro a milímetro. O tempo de contato foi de 5 min. (Figura 02), sendo os canais posteriormente lavados com soro fisiológico a 9% estéril.



Figura 02: Canal radicular recebendo o Azul de toluidina 0,0125%

Posicionando-se a fibra óptica do laser dentro do canal (Figura 03), o método utilizado na irradiação foi de movimentos helicoidais de tração dessa fibra, de apical para cervical, até que se concluísse o tempo total necessário para depósito da energia, 320 segundos. Enquanto era realizada a terapia no

dente do GT, o seu par correspondente do GC não teve nenhum tipo de tratamento aplicado.

Novas coletas eram realizadas com cone de papel absorvente.

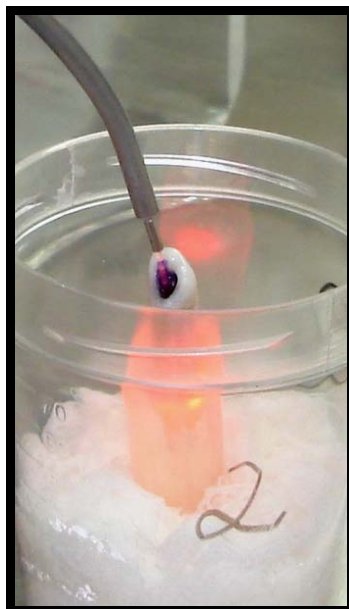


Figura 03: Fibra óptica do laser posicionada dentro do canal radicular.

Para realização das coletas pré e pós-terapia, posicionou-se um cone de papel absorvente calibre 50 durante 20 segundos dentro do canal radicular conforme protocolo (Hartrot 1999) (Figura 04); e depois mergulhado em 10 mL de solução salina estéril (Figura 05). Os tubos foram agitados em aparelho Vortex. durante 30 segundos, desagregando os grumos microbianos.



Figura 04: Cone de papel absorvente calibre 50 introduzido durante 20 segundos dentro do canal radicular.

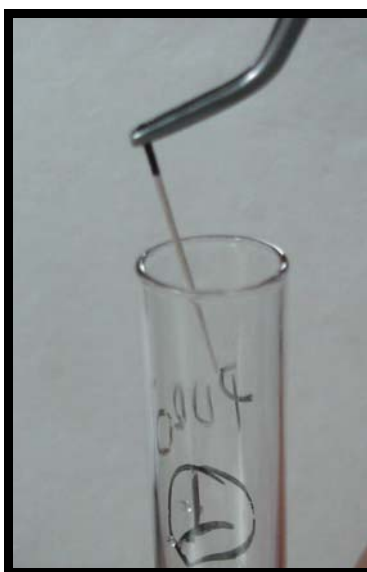


Figura 05: Cone absorvente sendo mergulhado em tubo de cultura contendo 10mL de solução salina.

De cada suspensão, uma alíquota de 0,1mL era transferida para tubo de ensaio com 0,9mL de solução salina, seguindo o método das diluições sucessivas para contagem das UFC. Foram feitas três diluições (1:10, 1:100 e 1:1000) e plaqueados 0,01mL das mesmas em meio Agar Bile Azida (Figura 06).



Figura 06: Diluições realizadas em 1:10, 1:100 e 1:1000 das coletas realizadas antes e após a TFD.

As placas foram incubadas por 15 horas, a 35°C, tempo necessário para que as bactérias atingissem a fase estacionária da curva de crescimento. A contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) se deu pelo método direto, utilizando-se a diluição de 1:100, por ter apresentado maior reprodutibilidade.

A contagem das UFC/mL foi realizada multiplicando-se o número de colônias por 10.000 (diluição de 1/100 somado ao inóculo de 0,01mL através de alça calibrada).

A identificação dos *Enterococcus faecalis* isolados nas placas de Agar Bile Azida foi realizada pelo equipamento MicroScan WalkAway® (Dade Behring) utilizando-se painéis para microorganismos Gram positivos (MicroScan Dried Gram-positive®). (Figura 07)

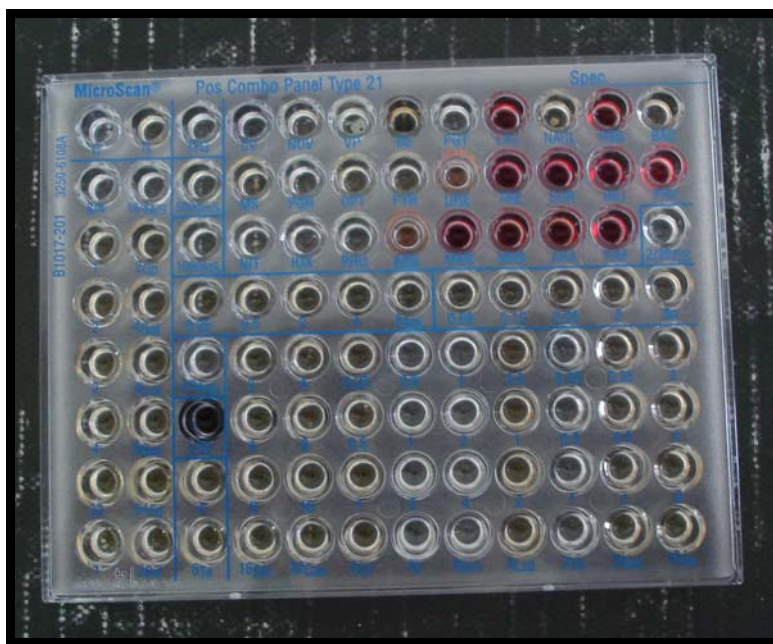


Figura 07: Painel para identificação de microorganismos Gram-positivos.

Para a realização deste estudo, utilizou-se o laser diodo multifuncional Unit Laser/Led (Eccofibras) com meio ativo de arseneto-gálio-alumínio (AsGaAl) e comprimento de onda de 660 nm. A emissão da luz deu-se de modo contínuo, com potência de 50mW, com ponteira de fibra ótica acrílica de 600 μm , a densidade de energia ou fluência irradiada foi de 400J/cm². Associado ao laser, utilizou-se uma solução aquosa do corante azul de toluidina 0,0125% (Fórmula e Ação) como fotossensibilizador.

4.4. Análise estatística

A distribuição das variáveis do estudo, em relação aos grupos de estudo, está apresentada em tabela de associação com função meramente descritiva. Devido às características das variáveis (nº inicial de colônias de *Enterococcus faecalis* e variação do nº de colônias após procedimentos) utilizaram-se testes não paramétricos para verificar as associações entre os períodos pré-procedimentos e pós-procedimentos nos grupos de terapia fotodinâmica e controle (teste de Wilcoxon e teste de Sinais) bem como para comparar os períodos pré e pós entre os grupos (teste de Mann-Whitney). Em todas as situações foi arbitrado um valor de significância de 5% ($p < 0,05$) para refutar a hipótese de nulidade.

5. Resultados

Na tabela 1 estão disponibilizados os resultados referentes aos procedimentos nos grupos de estudo, relacionados com a variação ocorrida entre as coletas pré e pós-procedimento.

Tabela 1 – distribuição da contagem de colônias de *Enterococcus faecalis* em canais radiculares de dentes contaminados nos grupos de estudo

Grupo teste				Grupo controle			
Dente	nº de colônias		Variação	Dente	nº de colônias		Variação
	Pré	Pós			Pré	Pós	
1	65.000	13.000	-80,0%	1	2.230.000	2.250.000	0,9%
2	1.200.000	40.000	-96,7%	2	2.700.000	2.990.000	10,7%
3	3.000.000	3.000	-99,9%	3	1.250.000	1.220.000	-2,4%
4	180.000	2.800	-98,4%	4	2.350.000	1.130.000	-51,9%
5	126.000	8.500	-93,3%	5	3.570.000	1.530.000	-57,1%
6	380.000	12.100	-96,8%	6	180.000	300.000	66,7%
7	1.800.000	11.700	-99,4%	7	3.200.000	3.000.000	-6,3%
8	3.800.000	1.000	-100,0%	8	2.200.000	2.600.000	18,2%
9	3.000.000	600	-100,0%	9	1.300.000	2.600.000	100,0%
10	450.000	300	-99,9%	10	2.600.000	2.200.000	-15,4%
11	2.200.000	0	-100,0%	11	840.000	1.300.000	54,8%
12	840.000	0	-100,0%	12	1.800.000	2.300.000	27,8%
13	1.300.000	7.600	-99,4%	13	1.170.000	1.200.000	2,6%
14	3.640.000	0	-100,0%	14	1.260.000	1.200.000	-4,8%
15	140.000	0	-100,0%	15	3.000.000	2.600.000	-13,3%
16	380.000	500	-99,9%	16	1.200.000	1.170.000	-2,5%
17	1.100.000	400	-100,0%	17	650.000	720.000	10,8%
18	390.000	0	-100,0%	18	1.800.000	1.950.000	8,3%
19	800.000	2.200	-99,7%	19	3.630.000	3.800.000	4,7%
20	40.000	0	-100,0%	20	2.350.000	2.530.000	7,7%
21	1.800.000	5.900	-99,7%	21	3.700.000	3.450.000	-6,8%
22	1.120.000	700	-99,9%	22	1.130.000	1.250.000	10,6%
23	400.000	200	-100,0%	23	550.000	480.000	-12,7%
Med	840.000	700	-99,9%	Med	1.800.000	1.950.000	2,6%
Min	40.000	0	-100,0%	Min	180.000	300.000	-57,1%
Máx	3.800.000	40.000	-80,0%	Máx	3.700.000	3.800.000	100,0%

teste de Mann-Whitney:

Med = mediana	terapia fotodinâmica pré x controle pré	(p = 0,07)
Min = mínimo	terapia fotodinâmica pós x controle pós	(p < 0,001)
Máx = máximo	variação terapia fotodinâmica x variação controle	(p < 0,001)

teste de Wilcoxon e teste de sinais:

terapia fotodinâmica pré x terapia fotodinâmica pós	(p < 0,001)
controle pré x controle pós	(p = 0,21)

A Mediana calculada no grupo teste foi de 840.000 UFC para as amostras pré-terapia fotodinâmica, e 700 UFC para as amostras pós-terapia fotodinâmica, chegando a uma diminuição percentual de colônias pós-terapia fotodinâmica de 99,9%, apresentando redução em todas as 23 amostras.

A Mediana calculada no grupo controle foi de 1.800.000 UFC para a primeira coleta, e 1.950.000 UFC para a segunda coleta, com intervalo de tempo igual ao da Terapia fotodinâmica executada no grupo teste, houve um aumento 2,6%, na qual destaca-se crescimento em 13 das 23 amostras .

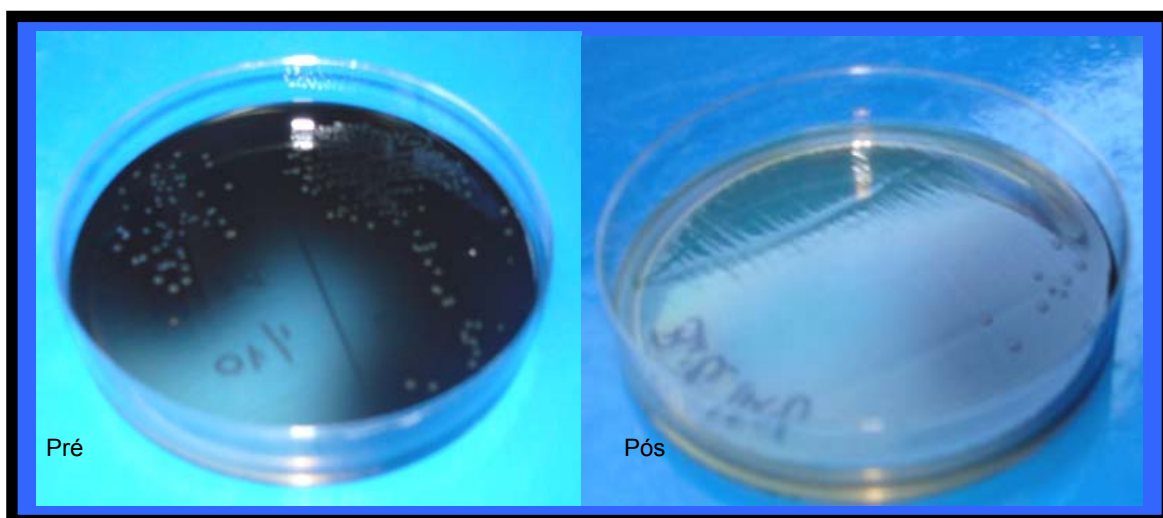


Figura 08: Placas contendo meio de cultura e Unidades Formadoras de Colônia (UFC), desenvolvidas a partir de coletas realizadas antes e após a aplicação da TFD (exemplo da amostra 10 do grupo teste).

6. Discussão

O reconhecimento da etiologia polimicrobiana da infecção endodôntica estimulou a busca de avanços farmacológicos, científicos e tecnológicos, no intuito de identificar novas condutas aplicáveis dentro da Endodontia, especialmente no que se refere ao controle microbiano no interior do canal radicular e nos tecidos periapicais.

A completa remoção ou inativação dos microorganismos dos canais radiculares infectados não é garantida somente pela instrumentação, sendo demonstrada a importância das substâncias auxiliares e medicação intracanal na efetividade do tratamento antimicrobiano. (Estrela *et al.* 1999).

Várias dessas substâncias em concentrações diversas foram testadas no intuito de se determinar aquela que fosse mais eficaz no complemento à fase mecânica da terapia endodôntica (Vahdaty *et al.* 1993, Orstavik e Haapasalo 1990, Siqueira *et al.* 1998, 2000). Entretanto a descontaminação de camadas mais profundas de dentina ainda é difícil, já que essas substâncias mostram-se eficazes apenas superficialmente, independente de suas concentrações (Vahdaty *et al.*, 1993). Isso se torna crítico, uma vez que a persistência de bactérias viáveis no sistema de canais radiculares pode comprometer o prognóstico de dentes tratados endodonticamente (Sjögren *et al.* 1990).

Neste estudo os dentes naturais foram acessados e instrumentados pela técnica cérvico-apical (Machado 1993) complementada pela irrigação de hipoclorito de sódio 0,5% e lavagem final com EDTA 17% e hipoclorito de sódio 0,5%. A utilização destas substâncias químicas teve como objetivo aumentar a permeabilidade dentinária. (Baumgartner e Cuenin 1992, Goldman *et al.* 1982).

Uma vez o canal instrumentado, essa ação mecânica promove uma deposição do *smear layer* (ou magma dentinário) nas paredes do canal, que é uma massa constituída de restos de dentina, polpa, além de elementos bacterianos vivos ou não, e constitui o principal fator limitante da ação dos medicamentos, impedindo-os de penetrar nos túbulos dentinários (Sen *et al.* 1995, Siqueira *et al.* 1998). No presente estudo, a remoção deste *smear layer* teve objetivo principal de facilitar a contaminação, num primeiro instante, e a penetração do corante fotossensível, no momento da aplicação da terapia.

Na técnica de Paiva e Antoniazzi (1988) ora utilizada, o hipoclorito de sódio 0,5% atuará na parte orgânica do magma, e o EDTA 17%, na porção inorgânica, ambos empregados após o último instrumento.

A utilização de microorganismo isolado ao invés de flora multi-bacteriana, mais comum na cavidade oral, é uma situação questionável nesse estudo. No entanto, a avaliação da literatura não evidencia a realização de modelos com múltiplas bactérias em virtude dessa terapia ser relativamente nova e em fase de estudo.

Na razão da escolha da bactéria *E. faecalis* levou-se em conta o fato das anaeróbias facultativas serem as predominantes nos casos de infecções resistentes ao tratamento endodôntico (Molander *et al.* 1998, Bamman e Estrela 1999). Além disso, essa é a espécie bacteriana mais freqüentemente isolada nos casos de infecções extra-radiculares refratárias, de acordo com os estudos prévios já realizados por Molander *et al.* (1998), Sundqvist *et al.* (1998), Hancock *et al.* (2001) e Pinheiro *et al.* (2003).

É reconhecido o fato de que essa bactéria apresenta resistência ao tratamento endodôntico convencional (Sundqvist *et al.* 1998) devido sua grande

capacidade de invadir túbulos dentinários, conferindo-lhe proteção em relação aos agentes irrigantes utilizados na terapia convencional (Siqueira Jr. *et al.* 1996, Oguntebi 1994, Love 2001) e tornando difícil sua eliminação mesmo nos estudos *in vitro*.

E. faecalis consegue sobreviver longos períodos sem nutrientes, permanecendo em estado latente até que o meio lhe ofereça condições favoráveis, como, por exemplo, uma infiltração coronária (Love *et al.* 2001, Haapasalo e Orstavik 1987, Figdor *et al.* 2003). Além disso, ela pode se manter sozinha nos canais radiculares, sem a cooperação de outras bactérias (Fabricius *et al.* 1982, Peciulienė *et al.* 2000).

No presente estudo, os canais radiculares dos 46 espécimes se tornaram ambiente favorável ao crescimento dessa bactéria após serem preenchidos pela suspensão de *E. faecalis* e incubados a 35°C, segundo normas da NCCLS. A incubação durante 48 horas propiciou tempo suficiente para penetração da bactéria em toda extensão dos túbulos dentinários, tomando-se como referência o trabalho de Orstavik e Haapasalo (1990).

Conhecendo-se o mecanismo de ação da Terapia Fotodinâmica em tumores, busca-se desenvolver um protocolo onde a mesma possa agir como um agente bactericida no tratamento endodôntico, iluminando alternativas de combate aos microorganismos mais resistentes. Para isso, se faz necessário o emprego de um sistema de aplicação que favoreça ao máximo resultados.

A melhor fonte de radiação empregada para a ativação do fotossensibilizador é descrita como aquela que, por um baixo custo, possa fornecer a maior quantidade de luz possível no máximo de absorção do

fotossensibilizador, sem efeitos térmicos significativos. Raramente são usadas lâmpadas de arco de xenônio, que requerem o emprego de filtros adequados para seleção do comprimento de onda, e de um sistema eficiente para dissipação do calor gerado.

As fontes de radiação são, atualmente, os lasers de baixa potência, que fornecem radiação na fluência adequada e no comprimento de onda apropriado para cada fotossensibilizador.

Uma alternativa de custo intermediário são os lasers de diodo, existindo no mercado aparelhos que cobrem praticamente todo o espectro visível e infravermelho próximo, o que favorece o atendimento de grande parte dos agentes fototerapêuticos existentes.

Um sistema óptico bastante eficiente no caso da aplicação em canais radiculares, como foi feito nesse estudo, é empregar um feixe de fibra óptica capaz de direcionar a radiação com um mínimo de perdas.

O AsGaAl é um laser de baixa potência que emite luz vermelha com comprimento de onda de 660nm e foi determinado para o presente estudo, considerando-se que a potência de 50mW apresenta bons resultados na literatura (Pinheiro *et al.* 2003, Matevski *et al.* 2003).

A maioria das bactérias orais não possui componentes capazes de absorver o laser no espectro do vermelho, com exceção das espécies pigmentadas de negro, como *Porphiromonas* e *Prevotella* (Wilson 1994) sendo necessário a administração de um fotossensibilizador para promover a terapia.

A escolha do fotossensibilizador foi baseada na capacidade do mesmo em absorver a luz no comprimento de onda do laser em questão. Os fotossensibilizadores azuis são muito utilizados na literatura mundial, sendo considerados os mais eficazes em experimentos comparativos (Dobson e Wilson 1992, Wilson *et al.* 1993, Wilson 1994), e a afinidade que o corante azul de toluidina apresenta pelo comprimento de onda do laser vermelho (620 a 660nm) (Wainwright 1999) determinou sua eleição para esse estudo.

Fotossensibilizadores são utilizados na literatura em diversas concentrações, sendo que todas apresentam resultados em maior ou menor grau. No entanto, para a aplicação em uma estrutura porosa como a dentina, existe a preocupação de alteração da cor, o que comprometeria a estética.

Nesse estudo o azul de toluidina foi utilizado em concentração de 0,0125%, concentração baixa, porém eficaz (Wilson e Dobson 1992), e aplicado durante cinco minutos conforme protocolo de Matevski *et al.* (2003). Passado esse período, o corante foi removido por meio de lavagem com soro fisiológico estéril, o que viabilizou ao máximo sua remoção.

Para esse tipo de aplicação da Terapia Fotodinâmica se faz necessário o desenvolvimento de um protocolo que impeça o tingimento da coroa dental ou que, pelo menos permita a completa remoção do manchamento, assim como foi desenvolvido para o iodofórmio, medicação intra-canal utilizada em tratamentos endodônticos que também pode alterar a cor da dentina se não aplicado corretamente.

Sendo o canal radicular um local de difícil acesso para o spot do aparelho laser, o raio foi focado por meio de um feixe de acrílico com diâmetro de 0,6 mm. Para tanto, os canais radiculares foram instrumentados até lima calibre 50, a fim de permitir uma melhor aproximação do feixe a ponta do canal radicular. Isso pode se tornar fator limitante nos casos de canais muito delgados, onde não é possível a instrumentação até a lima em questão.

O fato da região apical não ser totalmente alcançada pela ponteira pode ser atenuado pelo fato de que o maior percentual de microorganismos se encontra na região cervical (Shovelton 1964) e pelo fato da luz laser poder se espalhar por difusão, o que também pode levar a acreditar na ação da mesma na porção extra-radicular.

Nenhum dos espécimes foi submetido a uma segunda aplicação da Terapia Fotodinâmica, no entanto, ela tem como principal vantagem a não indução de resistência bacteriana, além da inexistência de efeitos colaterais inerentes ao corante, favorecendo sua reaplicação (Wilson 1993)

Apesar dos trabalhos de TFD variarem em relação ao laser utilizado e às concentrações e tipo de corante, os resultados são unânimes quanto à eficácia da terapia. Entende-se assim que a importância não está na escolha do laser ou do corante isoladamente, mas na escolha do conjunto laser-corante, que deve guardar afinidade, pois esse é o segredo do resultado obtido.

Quanto à terminologia empregada no objetivo desse estudo, no que diz respeito ao efeito bactericida da Terapia Fotodinâmica, considerou-se a denominação empregada por alguns autores, que relacionam a diminuição dos microorganismos ao efeito letal promovido pelo método (Wilson 1994, Teichert

et al. 2002, Ferreira 2003, Matevski *et al.* 2003), apesar de não terem sido realizadas avaliações de viabilidade ou vitalidade bacterianas, neste estudo.

No estudo *in vitro* realizado por Silbert *et al.* (2000) foi utilizado um laser HeNe ($\lambda = 632,8\text{nm}$) associado ao corante azul de metileno 0,01% alcançando redução de 40% do *E. faecalis*. No presente estudo, o laser AsGaAl ($\lambda = 660\text{nm}$) associado ao corante azul de toluidina 0,0125%, alcançou um resultado muito mais expressivo – 99,9% de redução do mesmo microorganismo.

O hipoclorito de sódio é a substância mais utilizada para irrigação dos canais radiculares e já foi testada em diversas concentrações para comprovação de sua eficácia. No estudo de Ayhan *et al.* (1999), os autores concluíram que esta solução a 5,25% foi efetiva contra todos os microorganismos testados, inclusive *E. faecalis*, em contrapartida, Komorovski *et al.* (2000) provaram que essa substância não foi capaz de penetrar os canalículos dentinários na mesma profundidade de contaminação do *E. faecalis*.

É evidente que vários experimentos clínicos testam, atualmente, a ação cumulativa de técnicas e procedimentos na busca de melhores resultados, no entanto, torna-se imprescindível a avaliação da metodologia experimental empregada, levando-se em conta detalhes que podem alterar significativamente o resultado final, o qual, sendo animador em laboratório, motiva sua reprodução e padronização da técnica operatória em pacientes.

Para o estudo *in vivo*, os supostos efeitos danosos que poderiam ser provocados pela Terapia Fotodinâmica em relação aos tecidos vivos não são relevantes, já que nessa área ocorre intensa renovação tecidual. Além disso, a

aplicação dessa terapia em cobaias já nos mostra que não ocorreram alterações histológicas no tecido sadio após sofrerem aplicação da mesma (Kömerick *et al.* 2002).

Cumprе ressaltar a necessidade eminente do desenvolvimento de novos experimentos buscando aprimorar o protocolo de aplicação clínica, tendo em vista o comportamento dos tecidos em relação a Terapia Fotodinâmica, assim como o manchamento da dentina em casos de corantes mais concentrados. A sua vez, o fato do diâmetro da fibra óptica possuir 0,6mm pode ser uma condição limitante da terapia quando aplicada em canais radiculares mais delgados, que impossibilitem a instrumentação até uma lima de calibre 50. No entanto, os resultados obtidos nesse estudo poderão servir de estímulo às empresas fabricantes quanto ao desenvolvimento de fibras que se adaptem a esses canais.

Com adaptações concluídas em estudos futuros solucionar as supostas dificuldades para o tratamento *in vivo*, temos que esta é, sem dúvida alguma, uma futura opção terapêutica de grande potencial.

7. Conclusão

Os resultados obtidos no presente estudo experimental *in vitro* permitem concluir que a Terapia Fotodinâmica (laser AsGaAl associado ao corante azul de toluidina 0,0125%) mostrou-se viável como agente bactericida no modelo de dente contaminado com *Enterococcus faecalis* sem obtenção de erradicação total no número de bactérias contaminantes.

8. Referências bibliográficas

Albuquerque DS, Diniz AS, Matheus TCU. Considerações clínicas sobre a microbiota endodôntica. <http://www.crope.org.br/revista/rev1099/artigo5.html>, 1999.

Allen RK, Newton CW, Brown CE. A statistical analysis of surgical and nonsurgical endodontic retreatment cases. *J Endod* 1989; 15: 261-6,.

Almeida-Lopes L. Análise in vitro da proliferação celular de fibroblastos de gengiva humana tratados com laser de baixa potência. [Dissertação de Mestrado] São José dos Campos: Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba 1999.

Alves FRF. Compreendendo a etiologia microbiana das infecções endodônticas *Rev Biocien* 2004; 10(1-2): 67-71.

Assed S, Ito IY, Leonardo MR, Silva LA, Lopatin DE. Anaerobic microorganisms in root canals of human teeth with chronic apical periodontitis detected by indirect immunofluoresce. *Endod Dent Traumatol* 1996; 12: 66-9.

Ayhan H, Sultan M, Çirak M, Ruhi MZ, Bodur H. Antimicrobial effects of various endodontic irrigants on selected microorganisms. *Int J Endod* 1999; 32(2): 99-102.

Bammann LL, Estrela C. Aspectos microbiológicos em endodontia. In: Estrela C, Figueiredo JAP. *Endodontia: aspectos biológicos e mecânicos*. São Paulo. Artes Médicas, 1999: 168-89.

Barrett MT. The internal anatomy of the teeth with special reference to the pulp with Branches. *Dent Cosmos* 1925; 67(6): 581-92.

Baumgartner JC, Cuenin PR. Efficacy of several concentrations of sodium hypochlorite for root canal irrigation. *J Endod* 1992; 18(12): 605-12.

Bechara EJH. Química da Vida: A dupla face do oxigênio. Informativo CRQ-IV, São Paulo 2002; 5; 8 – 10.

Bhatti M, MacRobert AJ, Henderson B, Wilson M. Exposure of *Porphyromonas gingivalis* to red light in the presence of the light-activated antimicrobial agent toluidine blue decreases membrane fluidity. *Current Microbiol* 2002; 45: 118-22.

Chan Y, Lai CH. Bactericidal effects of different laser wavelengths on periodontopathic germs in photodynamic therapy. 2003 *Lasers Med Scie* 18(1): 51-5.

Cheung GS. Endodontic failures – changing the approach. *Int Dent J* 1996; 46(3): 131-8.

Daniell MD; Hill JS. A history of photodynamic therapy. *Aust N Z J Surg* 1991; 61(5):340-8

DeUzeda M. Participação microbiana nas infecções da polpa dental e periápice. In:_____. Microbiologia oral: etiologia da cárie, doença periodontal e infecção endodôntica. Rio de Janeiro: Medsi, 2002, 89-100.

Dougherty TJ, Grindey GB, Fiel R, Weishaupt KR, Boyle DG. Photoradiation therapy. II. Cure of animal tumors with hematoporphyrin and light. *J Natl Cancer Inst* .1975; 55(1): 115-21.

Estrela C, Pécora JD. Hidróxido de cálcio na endodontia. <http://www.forp.usp.br/restauradora/calcio/hidroca.htm> 1997.

Fabricius L, Dahlén G, Holm SE, Moller AJR. Influence of combinations of oral bacteria on periapical tissues of monkeys. *Scand J Dent Res* 1982; 90(3): 200-6.

Ferreira J. Análise da necrose em tecidos normais fotossensibilizados pós-terapia fotodinâmica - estudo *in vivo*. [Dissertação de Mestrado] Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, SP, 104 p., 2003.

Figdor D, Davies JK, Sundqvist G. Starvation survival, growth and recovery of *Enterococcus faecalis* in human serum. *Oral Microbiol Immunol* 2003; 18(4): 234-9.

Foley I, Gilbert P. In vitro studies of the activity of glycopeptide combinations against *Enterococcus faecalis* biofilms. *J Antimicrob Chemother* 1997; 40: 667-72.

Freitas I, Baronzio GF. Tumor hypoxia, reoxygenation and oxygenation strategies: possible role in photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol*, 11, 3-30, 1991.

Garcez AS. Laser em baixa intensidade associado a fotossensibilizador para redução bacteriana intracanal comparado ao controle químico. [Dissertação de Mestrado] São Paulo 2002. 89p. IPEN / Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Garcez AS, Souza FR, Nuñez SC, Karther JM, Ribeiro MS. Terapia fotodinâmica em odontologia - laser de baixa potência para redução microbiana. *Rev APCD* 2003; 57(3): 223-26.

Genovese WJ. Laser de baixa intensidade: Aplicações terapêuticas em odontologia. 2000 Lovise, São Paulo.

Goldman M, Goldman LB, Cavaleri R, Bogis J, Lin PS. The efficacy of several endodontic irrigating solutions: a scanning electron microscopic study: part 2. *J Endod* 1982; 8(11): 487-92.

Gomes BP, Pinheiro ET, Gadê-Neto CR, Souza EL, Ferraz CC, Zaia AA, *et al.* Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiol Immunol* 2004; 19(2): 71-6.

Gonçalves L. Efeito de fotoativadores utilizados na irradiação laser intracanal. São Paulo, 2005. 126p. [Dissertação de Mestrado] Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Haapasalo M, Orstavik D. *In vitro* infection and disinfection of dentinal tubules. J Dent Research 1987; 66: 1375-9.

Haas R; Dörtbudak O; Mensdorff-Pouilly N; Mailath G. Elimination of bacteria on different implant surfaces through photosensitization and soft laser. An *in vitro* study. Clin Oral Impl Res 1997; 8(4):249-54.

Habash M, Reid G. Microbial biofilms: their development and significance for medical device-related infections. J Clin Pharm 1999, 39:887-98.

Hancock H, Sigurdsson A, Trope M, Moiseiwitsch J. Bacteria isolated after unsuccessful endodontic treatment in a North American population. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2001; 91(5): 579-86.

Hartrot B. Sampling of periodontal pathogens by paper points: evolution of basic parameters. Oral Microbiol Immunol 1999, 14(5): 326-30.

Takehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. Oral Surgery 1965; 20: 340-9.

Karu TI. Photobiology of low power laser effects. Health Phys 1989; 56: 691-704.

Kömerik N, Wilson M, Poole S. The Effect of Photodynamic Action on Two Virulence Factors of Gram-negative Bacteria. Photochem Photobiol. 2000; 72(5): 676-80.

Komorovski R, Grad H, Wu XY. Antimicrobial substantivity of chlorhexidine – treated bovine root dentin. J Endod. 2000; 26 (6), 315-7.

König K, Teschke M, Sigusch B, Glockmann E, Eick S, Pfister W. Red light kills bacteria via photodynamic action. *Cell Mol Bio* 2000; 46(7):1297-303,

Leonardo MR, Leal JM. Endodontia: tratamento de canais radiculares. 1998, 3 ed. São Paulo: Panamericana; 902p.

Lima, MA. Reparação de feridas cutâneas retardadas submetidas ao tratamento com laser em baixa intensidade, associado ou não à droga fotossensibilizadora. Marília, 2004. 79p. [Dissertação de Mestrado] Faculdade de Odontologia da Universidade de Marília.

Love RM. *Enterococcus faecalis* - a mechanism for its role in endodontic failure. *Int Endod J*. 2001;34(5):399-405.

Machado MEL. Análise morfométrica comparativa, à luz da computadorização em canais artificiais, de duas técnicas propostas para o preparo de canais radiculares curvos. São Paulo, 1993. 119p. (Tese de Doutorado) - Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Machado AEH. Terapia Fotodinâmica: Princípios, potencial de aplicação e perspectivas. *Química Nova* 2000, 23(2): 237-43.

Marques EB. Estudo da formação de biofilme em superfícies abióticas: influência de cátions divalentes e a ocorrência de determinantes de virulência em amostras clínicas de *Enterococcus faecalis*. Londrina, 2004. 136p. [Dissertação de Mestrado] – Universidade Estadual de Londrina.

Matevski D, Weersink R, Tenenbaum HC, Wilson B, Ellen RP, Lépine G. Lethal photosensitization of periodontal pathogens by a red-filtered Xenon lamp *in vitro*. *J Periodontal Res* 2003; 38(4):428-35.

Molander A, Reit C, Dahlén G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* 1998; 31(1): 1-7.

Oguntebi BR. Dentine tubule infection and endodontic therapy implications. *Int Endod J*. 1994; 27(4): 218-2.

Orstavik D, Haapasalo M. Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. *Endod Dent Traumatol* 1990; 6(3): 142-9.

Ochsner M. Photophysical and photobiological process in the photodynamic therapy of tumours. *J Photochem Photobiol* .1997; 39(1): 1-18.

Peciuliene V, Balciuniene I, Eriksen HM, Haapasalo M. Isolation of *Enterococcus faecalis* in previously root-filled canals in a Lithuanian population. *J Endod* 2000; 26(10): 593-5.

Pécora JD. Estudo da permeabilidade dentinária do assoalho da câmara pulpar dos molares inferiores humanos, com raízes separadas. Ribeirão Preto, 1990. 117p. [Tese de Doutorado] - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Paiva JG, Antoniazzi, JH. Endodontia: bases para a prática clínica. 2. ed. São Paulo (SP): Artes Médicas; 1988.

Pinheiro ET, Gomes B, Ferraz C, Sousa E, Teixeira F, Souza-Filho F. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J* 2003; 36(1):1-11.

Ribeiro JN, Silva AR, Jorge RA. Involvement of mitochondria in apoptosis of cancer cells induced by photodynamic therapy. *J Bras Patol Med Lab* 2004; 40(6): 383-90.

Roberts DJH, Cairnduff F. Photodynamic therapy of primary skin cancer: a review. *Br J Plast Surg* 1995; 48: 360-70.

Sen BH. ; Wesselink PR.; Turkun M. The smear layer: a phenomenon in root canal therapy. *Int Endod J* 1995; 28(3): 141-8.

Shin M, Marshall JF, Rosen S. The bactericidal efficiency of sodium Hypochlorite as an endodontic irrigant. *Oral Surg* 1970; 29(4): 613-9.

Shovelton DS. The presence and distribution of microorganisms within non-vital teeth. *Brit Dent J* 1964; 17(3):101-7.

Silva REB, Antoniazzi JH. Avaliação da limpeza promovida pelo EDTA e Dakin utilizados com o último instrumento no preparo das paredes do canal radicular. *ECLER Endod* 1999; 1(1).

Silbert T, Bird PS, Milburn GC, Walsh LJ. Disinfection of root canals by laser dye photosensitization [resumo IADR]. *J Dent Res* 2000, 79: 569.

Siqueira JF, Batista MM, Fraga RC, de Uzeda M. Antibacterial effects of endodontic irrigants on black-pigmented gram-negative anaerobes and facultative bacteria. *J Endod* 1998; 24(6): 414-6.

Siqueira JF, Rôças IN, Favieri A, Lima KC. Chemomechanical reduction of the bactericidal population in the root canal after instrumentation and irrigation with 1%, 2,5%, and 5,25% sodium hypochlorite. *J Endod* 2000; 26(6): 331-4.

Siqueira Jr F. A etiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. *Int Endod J* 2001; 34:1-10.

Siqueira Jr. F. Endodontic infections: concepts, paradigms and perspectives. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 2002; 94(3): 281-93.

Siqueira Jr F , Rôças IN. Polymerase chain reaction-based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2004; 97(1):85-94.

Siqueira JF, Uzeda M, Fonseca ME. A scanning electron microscopic evaluation of in vitro dentinal tubules penetration by selected anaerobic bacteria. *J Endod* 1996, 22(6): 100-10.

Siren E, Haapasalo M, Ranta K, Salmi P, Kerosuo E. Microbiological findings and clinical treatment procedures in endodontic cases selected for microbiological investigation. *Int Endod J* 1997; 30(2): 91-5.

Sjogren U, Håggglund B, Sundqvist G, Wing K. Factors affecting the long-term results of endodontic treatment. *J Endod* 1990; 16(10): 498-504.

Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re- treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998; 85(1): 86-93.

Tomé FM. Síntese e análise espectrofotométrica de naftalocianinas com aplicação na terapia fotodinâmica. São José dos Campos. 2002, 88p. [Dissertação de Mestrado], Universidade do Vale do Paraíba.

Tunèr J, Hode L. Laser therapy in dentistry and medicine. Edsbruk; Prima Books: 1996, 236p.

Teichert MC, Usacheva MN, Jones JW, Biel MA. Treatment of oral candidiasis with methylene blue-mediated photodynamic therapy in an immunodeficient murine model. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2002; 93(2):155-60.

Vahdaty A, Pitt-Ford TR, Wilson RF. Efficacy of chlorhexidine in disinfecting dentinal tubules in vitro. *Endod Dent Traumatol* 1993; 9: 243-48.

Waidelich R, Beyer W, Knüchel R, Stepp H, Baumgartner R, Schröder J, *et al*. Whole bladder photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid using a white light source. *Urology* 2003; 61(2): 332-7.

Wigdor HA, Walsh JT, Featherstone JDB, Visuri SR, Fried D, Waldvogel J L. Lasers in Dentistry. *Lasers Surg and Med* 1995; 16: 103-33.

Wieman TJ, Fingar VH. Terapia fotodinâmica em Schawesubger. In: *Clínicas Cirúrgicas da América do Norte*, v.3, Rio de Janeiro: Interlivros, 1992.

Wilson BD, Mang TS, Stoll H, Jones C, Cooper M, Dougherty TJ. Photodynamic therapy for treatment of basal cell carcinoma. Arch Dermatol 1992; 128: 1597-601.

Wilson M. Photolysis of oral bacteria and its potential use in the treatment of caries and periodontal disease. J Appl Bacteriol 1993; 75(4): 299-306.

Wilson M. Bactericidal effect of laser light and its potential use in the treatment of plaque-related diseases. Int. Dent J 1994; 44 (2):. 181-9.

Wilson M; Burns T; Pratten J. Killing of Streptococcus sanguis in biofilms using a light-activated antimicrobial agent. J Antimicrob Chemother 1996; 37(2):377-81.

Wilson M, Dobson J, Harvey W. Sensitization of oral bacteria to killing by low-power laser radiation. Curr Microbiol 1992; 25(2): 77-81.

9. Anexos

Anexo 1 (Carta de aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa)**COMPLEXO HOSPITALAR HELIÓPOLIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA****APROVAÇÃO**

São Paulo, 14 de outubro de 2005.

À

Dra. Michelle Bernardes Fonseca.

Informamos que o projeto de pesquisa: **“Análise da eficácia da terapia fotodinâmica aplicada in vitro para descontaminação de canais radiculares”**, registrado neste CEP sob nº424, tendo como relator Dr. Gilberto Marcucci foi aprovado por este Comitê de Ética em Pesquisa no dia 11/10/2005.

Lembramos que é obrigatório o envio de relatório anual e final para este Comitê de Ética em Pesquisa.

Atenciosamente,



Dr. Jozias de Andrade Sobrinho
Coordenador

Anexo 2 (Distribuição dos resultados em tabela fonte)Tabela 1 – distribuição da contagem de colônias de *Enterococcus faecalis* em canais radiculares de dentes contaminados nos grupos de estudo

Grupo terapia fotodinâmica				Grupo controle			
Dente	nº de colônias		Variação	Dente	nº de colônias		Variação
	Pré	Pós			Pré	Pós	
1	65.000	13.000	-80,0%	1	2.230.000	2.250.000	0,9%
2	1.200.000	40.000	-96,7%	2	2.700.000	2.990.000	10,7%
3	3.000.000	3.000	-99,9%	3	1.250.000	1.220.000	-2,4%
4	180.000	2.800	-98,4%	4	2.350.000	1.130.000	-51,9%
5	126.000	8.500	-93,3%	5	3.570.000	1.530.000	-57,1%
6	380.000	12.100	-96,8%	6	180.000	300.000	66,7%
7	1.800.000	11.700	-99,4%	7	3.200.000	3.000.000	-6,3%
8	3.800.000	1.000	-100,0%	8	2.200.000	2.600.000	18,2%
9	3.000.000	600	-100,0%	9	1.300.000	2.600.000	100,0%
10	450.000	300	-99,9%	10	2.600.000	2.200.000	-15,4%
11	2.200.000	0	-100,0%	11	840.000	1.300.000	54,8%
12	840.000	0	-100,0%	12	1.800.000	2.300.000	27,8%
13	1.300.000	7.600	-99,4%	13	1.170.000	1.200.000	2,6%
14	3.640.000	0	-100,0%	14	1.260.000	1.200.000	-4,8%
15	140.000	0	-100,0%	15	3.000.000	2.600.000	-13,3%
16	380.000	500	-99,9%	16	1.200.000	1.170.000	-2,5%
17	1.100.000	400	-100,0%	17	650.000	720.000	10,8%
18	390.000	0	-100,0%	18	1.800.000	1.950.000	8,3%
19	800.000	2.200	-99,7%	19	3.630.000	3.800.000	4,7%
20	40.000	0	-100,0%	20	2.350.000	2.530.000	7,7%
21	1.800.000	5.900	-99,7%	21	3.700.000	3.450.000	-6,8%
22	1.120.000	700	-99,9%	22	1.130.000	1.250.000	10,6%
23	400.000	200	-100,0%	23	550.000	480.000	-12,7%
Med	840.000	700	-99,9%	Med	1.800.000	1.950.000	2,6%
Min	40.000	0	-100,0%	Min	180.000	300.000	-57,1%
Máx	3.800.000	40.000	-80,0%	Máx	3.700.000	3.800.000	100,0%

teste de Mann-Whitney:

Med = mediana	terapia fotodinâmica pré x controle pré	(p = 0,07)
Min = mínimo	terapia fotodinâmica pós x controle pós	(p < 0,001)
Máx = máximo	variação terapia fotodinâmica x variação controle	(p < 0,001)

teste de Wilcoxon e teste de sinais:

terapia fotodinâmica pré x terapia fotodinâmica pós	(p < 0,001)
controle pré x controle pós	(p = 0,21)

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)