

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

PEDRO CESAR GOMES TITATO

**Análise da adesão do biofilme de *Enterococcus faecalis* em dentina  
bovina perante soluções irrigadoras em diferentes períodos**

BAURU  
2018

PEDRO CESAR GOMES TITATO

**Análise da adesão do biofilme de *Enterococcus faecalis* em dentina bovina perante soluções irrigadoras em diferentes períodos**

Monografia apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru como parte dos requisitos para conclusão do curso de especialização em Endodontia

Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio Hungaro Duarte

BAURU  
2018

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a energia que me move neste mundo que chamo de Deus.

Aos meus familiares, pois devo tudo que sou a eles.

A todos os meus professores que tive até o momento, que se dedicaram ao máximo para transmitir seus conhecimentos.

Aos meus amigos, que me ajudam sempre no caminho da vida.

E a todos que, de alguma forma, contribuíram para que este trabalho fosse possível de ser realizado.

## RESUMO

O *Enterococcus faecalis* é uma espécie bacteriana encontrada frequentemente em infecções persistentes do sistema de canais radiculares e analisar seu comportamento de adesão na dentina pode ajudar a entender a associação desta ao fracasso do tratamento endodôntico. Portanto o objetivo deste estudo foi observar a adesão da cepa de *Enterococcus faecalis* em blocos de dentina bovina tratados com EDTA e Cloreto de Benzalcônio a 1% e 5%, em tempos de 2, 4 e 7 dias. Os blocos foram obtidos através de dentes bovinos por meio de peça reta e trefina, foram previamente esterilizados e em seguida tratados com os irrigantes em questão (G1 – EDTA 17% + Cloreto de Benzalcônio 1%; G2- EDTA 17% + Cloreto de Benzalcônio 5%; G3- EDTA 17%; G4- Soro Fisiológico.) por um período de 5 minutos, sendo então, neutralizados em soro fisiológico. Utilizou-se a bactéria *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) para contaminação dos espécimes, em cada poço de uma placa de 24 poços foram adicionados BHI + inóculo + bloco de dentina, sendo mantidos em estufa a 37 °C pelos tempos preconizados neste estudo. Cessado este tempo, os espécimes foram lavados abundantemente com 2 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS). Logo após os espécimes foram corados com o kit Live/Dead, sendo imediatamente analisados utilizando um microscópio confocal invertido TCS-SPE (*Leica Microsystems GmbH, Mannheim, Alemanha*). Para mensuração dos resultados, o biovolume foi analisado através de programa bioimage. Em consideração de porcentagem de bactérias vivas conclui-se que apesar da redução observada entre os grupos não obteve diferença estatisticamente significativa entre os grupos e nem entre os tempos de 1 hora, 2 dias e 7 dias. Já em relação ao biovolume total de cada grupo, apesar da redução encontrada, conclui-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos nos períodos de 1 hora, 2 dias e 7 dias.

Palavras-chave: Dentina. *Enterococcus faecalis*. Irrigantes do canal radicular.

## ABSTRACT

### **Analysis of the adhesion of *Enterococcus faecalis* biofilm on bovine dentin to irrigation solutions in different periods**

*Enterococcus faecalis* is a bacterial specie found frequently in persistent infections of the root canal system and to analyze its adhesion behavior in the dentin can help to understand the association of this to the failure of the endodontic treatment. Therefore, the objective of this study was to observe the adhesion of the *Enterococcus faecalis* strain in bovine dentin blocks treated with EDTA and Benzalkonium chloride at 1% and 5%, at times of 2, 4 and 7 days. The blocks were obtained through bovine teeth by means of a straight piece and trephine, previously sterilized and then treated with the irrigators in question (G1 - EDTA 17% + Benzalkonium Chloride 1%, G2 - EDTA 17% + Benzalkonium Chloride 5%, G3- EDTA 17%, G4- Saline solution) for a period of 5 minutes, and then neutralized in saline solution. The bacteria *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) were used for contamination of the specimens, in each well of a 24-well plate were added BHI + inoculum + dentin block, being kept in an oven at 37°C for the times recommended in this study. After this time, the specimens were washed extensively with 2 mL of phosphate buffered saline (PBS). Shortly after the specimens were stained with the Live / Dead kit, they were immediately analyzed using a TCS-SPE inverted confocal microscope (Leica Microsystems GmbH, Mannheim, Germany). For the measurement of the results, the biovolume was analyzed through bioimage program. It was concluded that, despite the observed reduction between the groups, there was no statistically significant difference between the groups and nor between the time of 1 hour, 2 days and 7 days. Regarding the total biovolume of each group, despite the reduction found, it was concluded that there was no statistically significant difference between the groups in the periods of 1 hour, 2 days and 7 days.

.

Keywords: Dentin. *Enterococcus faecalis*. Canals irrigations.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Porcentagem de bactérias vivas	31
Tabela 2 - Biovolume	32

## LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

BAK	Cloreto de Benzalcônio
NaOCI	Hipoclorito de Sódio
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetra-acético

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b>	17
2	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	20
3	<b>PROPOSIÇÃO</b>	23
4	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	27
5	<b>RESULTADOS</b>	31
6	<b>DISCUSSÃO</b>	33
7	<b>CONCLUSÕES</b>	37
	<b>REFERÊNCIAS</b>	39

# 1 Introdução

## 1 INTRODUÇÃO

A adesão inicial de micro-organismos em um substrato é essencial para que ocorra a formação de biofilme. As bactérias produzem uma membrana de exopolissacarídeos de arquitetura especial permitindo a difusão de nutrientes e a sua fixação no hospedeiro, impedindo ou dificultando sua remoção. O *Enterococcus faecalis* é uma espécie bacteriana encontrada frequentemente em infecções persistentes do sistema de canais radiculares (Portenier et al., 2003) e analisar seu comportamento de adesão na dentina pode ajudar a entender a associação desta ao fracasso do tratamento endodôntico.

*E. faecalis* possui diferentes fatores de virulência que permite-lhe aderir à dentina e invadir os túbulos dentinários, também possui a capacidade de formar um biofilme de monocultura (Chavez de Paz et al., 2010) e pode se adaptar a fortes mudanças no ambiente. Quando invadem os túbulos dentinários, resiste aos medicamentos endodônticos, o que torna sua eliminação difícil. Essa espécie também expressa fatores que ajudam a sua adesão às células hospedeiras e à matriz extracelular, facilitando ainda mais a invasão dos tecidos.

A remoção mecânica é o método mais eficaz para tratar infecções mediadas por biofilme, no entanto, este procedimento é influenciado pela sua localização na infecção endodôntica. Quando situadas em biofilme, as bactérias estão protegidas e são muito mais resistentes do que na sua forma isolada (Nair et al., 2005). Biofilmes localizados dentro do canal ou nos túbulos dentinários podem ser removidos com o preparo químico-mecânico, já os que estão localizados no ápice podem necessitar de uma intervenção mais invasiva, a cirurgia parendodôntica. Devido à complexidade em atingir o biofilme, é necessário que os irrigantes apresentem certas propriedades como função antimicrobiana, dissolução de tecido e também de smear layer (Bystrom et al., 1985; Sundqvist et al., 1983; Zehnder et al., 2006).

Para que não ocorra a adesão das bactérias no substrato e posteriormente a formação de um biofilme, devemos tratar a superfície em que ela irá se aderir, modificando as propriedades físico-químicas (Park et al., 2004), ou seja, o tratamento de superfície tem potencial de prevenir adesão bacteriana (Cloet et al., 2001; Pereira et al. 2006; Meylheuc et al., 2006; Splendiani et al., 2006).

No preparo químico-mecânico dos canais radiculares utilizam-se diferentes tipos de irrigantes (Zehnder et al., 2006), dentre eles o padrão mais utilizado está o

hipoclorito de sódio (NaOCl), que promove uma dissolução de tecido orgânico e atua como um bactericida de amplo espectro (Zehnder et al., 2006). No entanto, mesmo realizando a irrigação com NaOCl a 5%, quase um terço da metade do canal radicular permanece contaminado (Byström et al., 1985). Durante a instrumentação do sistema de canais radiculares é formada a camada de smear layer, que é composta por restos teciduais orgânicos, dentina, micro-organismos e matéria inorgânica gerada devido à ação mecânica dos instrumentos contra as paredes do canal (Sen; Wesselink; Turkun, 1995). Essa camada é capaz de obliterar os túbulos dentinários (Sen et al., 1995) e prejudica o posterior selamento tridimensional do canal radicular (Kokkas et al., 2004; Saleh et al., 2002; Shahravan et al., 2007), além de poder abrigar bactérias responsáveis pelo fracasso endodôntico, como o *Enterococcus faecalis* (Sen et al., 2003; Sen; Safavi; Spangberg, 1997; Turk; Ates; Sen, 2008; Bae, 2002; Yang et al., 2006) .

O ácido etilenodiaminotetra-acético (EDTA) é um agente quelante responsável principalmente pela eliminação da camada inorgânica proveniente da instrumentação (Haapasalo et al., 2014; Zehnder et al., 2006), expondo matriz de colágeno e aumentando a permeabilidade, dureza e molhabilidade (Ari; Erdemir, 2005; Ari; Erdemir; Belli, 2004; Ballal et al., 2010; Dogan; Çalt, 2001; Hu; Ling; et al., 2010; Patil; Uppin, 2011; Perezheredia et al., 2008; Tartari et al., 2013).

O cloreto de benzalcônio (BAK) é um detergente catiónico utilizado comumente na odontologia e oftalmologia devido suas fortes atividades antibacterianas. Na odontologia seu uso se faz mais presente nos enxaguatórios bucais (Nomura et al., 2010). Seu potencial antibacteriano depende de mudanças provocadas na resistência iônica das membranas celulares (Pozarowska et al., 2011). Na literatura científica ainda é escasso o número de trabalhos relacionando o tratamento de superfície com o cloreto de benzalcônio e a adesão de micro-organismos, principalmente no uso clínico, porém alguns estudos já mostraram sua interferência no mecanismo de adesão (Jaramillo et al., 2012).

## 2 Revisão de Literatura

---

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

Embora estudos no passado tenham verificado a eficácia de diferentes irrigantes endodônticos, muito poucos investigaram a influência destes diferentes irrigantes na adesão de bactérias ou, mais especificamente, *E. faecalis* à dentina do canal radicular, sendo esta a espécie de bactéria utilizada por muitos pesquisadores para avaliar efeitos antimicrobianos de medicações e irrigantes (Siqueira et al. 1998; Abdulah et al. 2005).

Calas (1994) concluiu que a adesão de *Streptococcus sanguis* poderia ser reduzida pela remoção de smear layer através do tratamento prévio de superfície com ácido cítrico. Em outro trabalho, Calas (1998) verificou-se a adesão de outra cepa de bactérias, *Prevotella nigrescens*, em dentina bovina previamente tratada com ácido cítrico 6% e hipoclorito de sódio a 6,25%. Quando comparadas com as amostras que somente foram imersas na água destilada, a adesão foi considerada significativamente menor no grupo em que houve tratamento prévio de superfície.

Por outro lado, no estudo de Love (1996), sugeriu-se que a adesão de *S. gordonii* não foi alterada pela remoção de smear layer. Já no estudo de Yang e colaboradores (2006), os resultados sugeriram que a smear layer aumentou a aderência de *E. faecalis* à dentina e que a clorexidina é um agente químico eficaz na redução da adesão de microorganismos.

Em relação ao pH do meio, Kayaoglu (2005) mostrou que quanto mais alcalino, maior será a capacidade de ligação do *E. faecalis* ao colágeno presente nos túbulos dentinários. Esse aumento de pH pode ocorrer quando há o emprego de medicação alcalina (hidróxido de cálcio), por isso esta espécie de bactéria costuma ser predominante em quadros de infecção endodôntica persistente.

## 3 Proposição

### 3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi observar a adesão da cepa de *Enterococcus faecalis* em blocos de dentina bovina tratados com EDTA e Cloreto de Benzalcônio a 1% e 5%, em tempos de 2, 4 e 7 dias.

## *Material e Métodos*

---

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

Blocos de dentina, obtidos através de dentes bovinos por meio de peça reta e trefina, foram previamente esterilizados e em seguida tratados com os irrigantes em questão (G1 – EDTA 17% + Cloreto de Benzalcônio 1%; G2- EDTA 17% + Cloreto de Benzalcônio 5%; G3- EDTA 17%; G4- Soro Fisiológico.) por um período de 5 minutos, sendo então, neutralizados em soro fisiológico.

Utilizou-se a bactéria *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) para contaminação dos espécimes. Para isto, 15µl de suspensão bacteriana foram adicionados à 3 mL de caldo de infusão de cérebro e coração (BHI) (Difco; Diagnostics BD, Sparks, MD) para crescimento *over night*. (período de 24 horas). Em espectrofotômetro então, a densidade bacteriana foi ajustada em  $1 \times 10^7$  UFC/mL.

Para contaminação, em cada poço de uma placa de 24 poços foram adicionados: 975µl de BHI + 25 µl do inóculo + bloco de dentina, sendo mantidos em estufa a 37 °C pelos tempos preconizados neste estudo (1, 48 e 168 horas). Cessado este tempo, para remoção de micro-organismos não aderidos à superfície do bloco, os espécimes foram lavados abundantemente com 2 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS).

Em seguida, os espécimes foram corados com o kit Live/Dead *Badlight* (Invitrogen, Molecular Probes, Carlsbad, CA, EUA) por 15 minutos em ambiente escuro, sendo imediatamente analisados utilizando um microscópio confocal invertido TCS-SPE (*Leica Microsystems GmbH, Mannheim, Alemanha*). Para mensuração dos resultados, o biovolume foi analisado através de programa bioimage.

## *5 Resultados*

## 5 RESULTADOS

Na primeira tabela abaixo, encontram-se os resultados em porcentagem de bactérias vivas. Sendo: G1 – EDTA 17%; G2 – EDTA 17% + Cloreto de Benzalcônio 1%; G3 – EDTA 17% + Cloreto de Benzalcônio 5% e G4 – Controle.

Porcentagem de bactérias vivas:

	G1	G2	G3	G4
1 hora	726 <sup>Ba</sup> (273 – 1902)	4245 <sup>Aa</sup> (1226 – 16231)	2857 <sup>Aa</sup> (135 – 43216)	4630 <sup>A</sup> (3032 – 10131)
2 dias	2796 <sup>Ab</sup> (614 – 18015)	4536 <sup>Aa</sup> (307 – 55506)	16393 <sup>Bb</sup> (1057 – 84347)	3971 <sup>AB</sup> (967 – 34997)
7 dias	78009 <sup>Bc</sup> (2042 – 939196)	51807 <sup>BCb</sup> (6779 – 525659)	23063 <sup>ACc</sup> (3556 – 354952)	24667 <sup>A</sup> (774 – 323191)

Letras diferentes indicam diferenças significantes ( $P < 0.05$ ) entre os tempos para cada tratamento de superfície.

Através da interpretação dos dados tabulados, podemos concluir que o grupo G2 (EDTA 17% + Cloreto de Benzalcônio 1%) obteve o menor valor para o tempo de 1 hora, sem diferenças estatísticas entre os outros grupos.

Para os valores no tempo de 2 dias, o melhor resultado foi para o grupo G3 (EDTA 17% + Cloreto de Benzalcônio 5%), seguido do grupo G2. O grupo 1 (EDTA 17%) e o grupo 4 (controle) não tiveram diferenças estatísticas

Já para o tempo de 7 dias, a melhor ação foi para o grupo G3, seguido do G1 e G2 sem diferenças entre si, sendo que a pior ação se deu para o controle.

Na segunda tabela, obtivemos os valores em relação ao biovolume total de cada grupo.

Biovolume:

	G1	G2	G3	G4
1 hora	726 <sup>Ba</sup> (273 – 1902)	4245 <sup>Aa</sup> (1226 – 16231)	2857 <sup>Aa</sup> (135 – 43216)	4630 <sup>A</sup> (3032 – 10131)
2 dias	2796 <sup>Ab</sup> (614 – 18015)	4536 <sup>Aa</sup> (307 – 55506)	16393 <sup>Bb</sup> (1057 – 84347)	3971 <sup>AB</sup> (967 – 34997)
7 dias	78009 <sup>Bc</sup> (2042 – 939196)	51807 <sup>BCb</sup> (6779 – 525659)	23063 <sup>ACc</sup> (3556 – 354952)	24667 <sup>A</sup> (774 – 323191)

---

Letras diferentes indicam diferenças significantes ( $P < 0.05$ ) entre os tempos para cada tratamento de superfície.

Em relação ao dados obtidos para o biovolume, podemos afirmar que no tempo de 1 hora, o EDTA 17% teve menor biovolume , sem diferenças estatísticas para os outros grupos. Para o intervalo de tempo de 2 dias, o EDTA 17%, EDTA + Cloreto de Benzalconio 1% e Controle não tiveram diferenças estatísticas, sendo o maior biovolume para o grupo G3.

No tempo de 7 dias, o menor biovolume para foi observado no grupo G3 e controle, sem diferenças estatísticas para o EDTA a 17% e EDTA + Cloreto de Benzalconio a 1%.

---

## 6. DISCUSSÃO

Quando o tratamento endodôntico é realizado seguindo seus princípios clínicos e sob assepsia, a chance do sucesso é alta e fica em torno de 85% a 90% (Moven et. al 1976). Entretanto nos deparamos também com casos de fracasso, nos quais podem ter havido falha na técnica do tratamento e quebra da cadeia asséptica ou até mesmo um reagudecimento dos sintomas em um dente que aparentemente estava bem obturado. Nestes casos que necessitam de intervenção devido à infecção secundária estão relacionados com a persistência de certas espécies de microrganismos confinadas no ápice e nos túbulos dentinários (Nair et. al 1990).

Uma das espécies mais notáveis nos quadros de reintervenção é o *Enterococcus faecalis*, ela conseguem se manter em estado latente e não precisa estar associada a outras bactérias para sobreviver, além de apresentar resistência, em certos casos, ao hidróxido de cálcio. Esta cepa não é favorecida em canais não tratados, se apresentando somente de uma pequena proporção da flora inicial. Sucessivamente, ao utilizar-se medicações intracanal e, devido a alteração da estrutura dentinária perante a instrumentação e de agentes quelante como o EDTA, a cepa de bactérias pode se manter viável nos túbulos e confinada levando um futuro fracasso (Bryston et. al 1985).

O EDTA é uma solução quelante irrigadora responsável pela remoção da camada denominada *smear layer*, composta por material inorgânico como debris dentinários. Esta solução expõe as fibrilas de colágeno, alterando sua superfície e a tornando mais permeável e diminuindo sua dureza. Por outro lado, este composto não possui uma capacidade antimicrobiana desejável, o que leva o operador a associar irrigantes que diluam matéria orgânica, como o hipoclorito de sódio (NaOCL), durante a irrigação. Além destas duas soluções mundialmente conhecidas no ramo da Endodontia, tem-se buscado novos irrigantes e protocolos frente à infecção persistente ou tardia.

O cloreto de benzalcônio (BAK) é um composto do grupo amônio quaternário que tem propriedades antissépticas e tem sido estudado por Jaramillo e colaboradores em relação ao seu uso no tratamento de superfícies dentinárias nos casos de infecções persistentes de *Enterococcus faecalis*, atuando no seu mecanismo de adesão. Este mecanismo de adesão é a primeira etapa necessária

---

para a formação do biofilme, portanto entender a relação superfície-hospedeiro e bactéria pode ajudar na resolução de casos de insucesso.

O tratamento de superfície proposto no trabalho de Jaramillo et. al 2012 foi da utilização de Cloreto de Benzalcônio isolado a 13% e Hipoclorito de Sódio a 1%, e observou durante os períodos de 2, 24 e 96 horas. Foi possível concluir que o BAK interagiu com a bicamada lipídica das bactérias alterando sua estrutura e levando a desorganização desta camada, promovendo um extravasamento dos materiais citoplasmáticos e consequente morte celular. Além deste potencial bactericida, também concluiu-se que o BAK tem capacidade de redução de biofilme no estágio inicial, ou seja, de adesão. Diante disso, propôs-se no presente estudo o tratamento dos espécimes com a associação de EDTA + BAK em diferentes concentrações.

Em relação aos resultados obtidos pode-se observar que obteve-se a redução de bactérias vivas utilizando esses novos métodos testados assim como diminuição do biovolume ou seja redução da adesão das bactérias. Apresentou-se assim um potencial bactericida de importância clínica, considerando a escassez de referências científicas sobre o assunto nota-se a necessidade de novos estudos dessa associação de irrigantes.

## 7 Conclusões

---

**7 Considerações Finais**

Em consideração de porcentagem de bactérias vivas conclui-se que apesar da redução observada entre os grupos não obteve diferença estatisticamente significativa entre os grupos e nem entre os tempos de 1 hora, 2 dias e 7 dias.

Em relação ao biovolume total de cada grupo, apesar da redução encontrada, conclui-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos nos períodos de 1 hora, 2 dias e 7 dias.

## *Referências*

---

**REFERÊNCIAS**

Abdullah M., Ng YL, Gulabivala K., Moles D.R., Spratt DA. Susceptibilities of two *Enterococcus faecalis* phenotypes to root canal medications. *J Endod* 2005;31:30–6.

Byström A., Sundqvist G. The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. *Int Endod J* 1985;18:35–40.

Calas P., Rochd T., Druilhet P., Azais JM. In vitro adhesion of two strains of *Prevotella nigrescens* to the dentin of the root canal: the part played by different irrigation solutions. *J Endod* 1998;24:112–5.

Calas P, Rochd T, Michel G. In vitro attachment of *Streptococcus sanguis* to the dentin of the root canal. *J Endod* 1994;20:71–4.

Chavez de Paz LE, Bergenholtz G, Svensäter G. The effects of antimicrobials on endodontic biofilm bacteria. *J Endod* 2010;36:70–7.

Gottenbos B, Grijpma DW, van der Mei HC, Feijen J, Busscher HJ. Antimicrobial effects of positively charged surfaces on adhering Gram-positive and Gram-negative bacteria. *J Antimicrob Chemother* 2001;48:7–13.

Haapasalo M, Ørstavik D. In vitro infection and disinfection of dentinal tubules. Cloete TE, Oosthuizen DJ. The role of extracellular exopolymers in the removal of phosphorus from activated sludge. *Water Res* 2001;35:3595–8.

Jaramillo DE, Arriola A, Safavi K, et al. Decreased bacterial adherence and biofilm growth on surfaces coated with a solution of benzalkonium chloride. *J Endod* 2012; 38:821–5.

Kayaoglu G, Erten H, Ørstavik D. Growth at high pH increases *Enterococcus faecalis* adhesion to collagen. *Int Endod J* 2005;38:389–96.

Love RM. Adherence of *Streptococcus gordonii* to smeared and nonsmeared dentine. *Int Endod J* 1996;29:108–12.

Meylheuc T, Methivier C, Renault M, Herry JM, Pradier CM, Bellon-Fontaine MN. Adsorption on stainless steel surfaces of biosurfactants produced by gram-negative and gram-positive bacteria: consequence on the bioadhesive behavior of *Listeria monocytogenes*. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2006;52:128–37.

Molven O. The frequency, technical standard and results of endodontic therapy. *Norske Tannlaegeforenings Tidende* 1976;86:142–7.

Nair PNR, Henry S, Cano V, et al. Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after “one-visit” endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005;99:231–52. 9.

---

Nair PNR. On the causes of persistent apical periodontitis: a review. *Int Endod J* 2006;39:249–81.

Nair PNR, Sjtigren U, Kahnberg K-E, Sundqvist G. Intraradicular bacteria and fungi in root-filled asymptomatic human teeth with therapy-resistant periapical lesions: a longterm light and electron microscopic follow-up study. *J Endod* 1990;16:580-8.

Nakamichi I, Iwaku M, Fusayama I. Bovine teeth as possible substitutes in the adhesion test. *J Dent Res* 1983;62:1076-81.

Nomura Y, Bhawal UK, Nishikiori R, Sawajiri M, Maeda T, Okazaki M. Effects of highdose major components in oral disinfectants on the cell cycle and apoptosis in primary human gingival fibroblasts in vitro. *Dent Mater J* 2010;29:75–83.

Park Y, Park SN, Park SC, et al. Antibiotic activity and synergistic effect of antimicrobial peptide against pathogens from a patient with gallstones. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;321:631–7.

Pereira HA. Novel therapies based on cationic antimicrobial peptides. *Curr Pharm Biotechnol* 2006;7:229–34.

Portenier I, Waltimo TM, Haapasalo M. *Enterococcus faecalis*: the root canal survivor and 'star' in post-treatment disease. *Endod Topics* 2003;6:135–59.

Pozarowska D, Pozarowski P. Benzalkonium chloride (BAK) induces apoptosis or necrosis, but has no major influence on the cell cycle of Jurkat cells. *Folia Histochem Cytobiol* 2011;49:225–30.

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

Siqueira JF Jr. Microbial causes of endodontic flare-ups. *Int Endod J* 2003;36:453–65.

Splendiani A, Livingston AG, Nicolella C. Control of membrane-attached biofilms using surfactants. *Biotechnol Bioeng* 2006;94:15–23.

Tsibouklis J, Stone M, Thorpe AA, et al. Preventing bacterial adhesion into surfaces: the low-surface-energy approach. *Biomaterials* 1999;20:1229–35.

Yang SE, Bae KS. Scanning electron microscopy study of the adhesion of *Prevotella nigrescens* to the dentin of prepared root canals. *J Endod* 2002;28:433–7.