

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
MESTRADO EM ENDODONTIA

RAFAEL CHIES HARTMANN

**ANÁLISE MORFOLÓGICA E DA VIABILIDADE CELULAR MICROBIANA EM
BIOFILMES INDUZIDOS EM CANAIS RADICULARES DE DENTES
HUMANOS EXTRAÍDOS, ACOPLADOS A UM DISPOSITIVO INTRABUCAL**

Porto Alegre

2015

RAFAEL CHIES HARTMANN

**ANÁLISE MORFOLÓGICA E DA VIABILIDADE CELULAR MICROBIANA EM
BIOFILMES INDUZIDOS EM CANAIS RADICULARES DE DENTES
HUMANOS EXTRAÍDOS, ACOPLADOS A UM DISPOSITIVO INTRABUCAL**

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do grau de Mestre na área de Endodontia pelo Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Linha de Pesquisa: Etiopatogênese e tratamento das doenças periodontais e periapicais

Orientador: Prof. Dr. José Antônio Poli de Figueiredo

Porto Alegre
2015

RAFAEL CHIES HARTMANN

**ANÁLISE MORFOLÓGICA E DA VIABILIDADE CELULAR MICROBIANA EM
BIOFILMES INDUZIDOS EM CANAIS RADICULARES DE DENTES
HUMANOS EXTRAÍDOS, ACOPLADOS A UM DISPOSITIVO INTRABUCAL**

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do grau de Mestre na área de Endodontia pelo Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Aprovada em: _____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. José Antônio Poli de Figueiredo

Prof^a. Dr^a. Silvana Beltrami Gonçalves Waltrick

Prof. Dr. Tiago André Fontoura de Melo

Porto Alegre
2015

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais **Iliane Chies Hartmann** e **Martim Darlei Hartmann**, por sempre abrirem mão de seus sonhos em detrimento dos meus, transformando minha caminhada menos penosa; espero um dia poder retribuir de alguma forma e ser motivo de orgulho, provando que esse investimento não foi em vão.

À minha Avó **Ely Maria Hartmann**, que foi decisiva na decisão de viver odontologia. Me mostrou que esta abençoada profissão, tem como missão ajudar as pessoas e que por isso, faz-se necessário o constante aprimoramento do cirurgião-dentista que a ela se dedica.

À minha irmã **Tatiana Hartmann Biasi** e meu cunhado **Edson Larry Biasi**, pelo companheirismo e por poder contar com vocês sempre que preciso. Obrigado por desde o início de minha vida profissional terem me ensinado que a odontologia é realmente aprendida a fundo no dia a dia com nossos pacientes.

À minha orientadora na primeira etapa desta dissertação **Prof.^a Dr.^a Fabiana Vieira Vier Pelisser** por todos os ensinamentos e desafios propostos. Sua dedicação ao ensino e a pesquisa são motivos de admiração e inspiração. Lamento apenas termos convivido por pouco tempo, mas com certeza fizeste toda a diferença em minha formação.

Ao **Prof. Dr. Francisco Montagner**, por ter compartilhado, com tanta simplicidade seus infinitos conhecimentos, fazendo dos assuntos complexos os mais fáceis de serem entendidos. Agradeço por poder aprender com tanta sabedoria e dedicação à ciência.

À **Prof.^a Dr.^a Roberta Kochenborger Scarparo**, por toda dedicação e empenho em tentar me tornar um bom aluno, seu amor à docência e a pesquisa sempre me inspiram a continuar. Sua contribuição foi essencial pra que este trabalho pudesse ser realizado. Muito obrigado Professora.

Ao meu orientador **Prof. Dr. José Antônio Poli de Figueiredo**, por ser um exemplo em todos os momentos, de dedicação à ciência e à docência. Apesar de inúmeras funções acumuladas sempre consegue nos orientar da melhor maneira. Muito Obrigado Professor.

A todos os professores da PUCRS, pelos ensinamentos, e em especial aos professores da endodontia por ampliar meus conhecimentos na prática da docência endodôntica.

A todos os colegas do pós-graduação em Odontologia da PUCRS, em especial aos colegas da endodontia, obrigado pela parceria e pelos conhecimentos compartilhados.

À **Prof.^a Dr.^a Lilian Neuvald Zanatta**, pelo estímulo, dedicação, e por ter acreditando no meu potencial mais do que eu mesmo. Sempre será minha mestra e estrela guia no caminho da endodontia. Muito Obrigado Professora.

À **Prof.^a Dr.^a Silvana Beltrami Gonçalves Waltrick**, pela amizade, por todos ensinamentos: endodônticos e de vida, sendo constantemente um exemplo para mim de força de vontade, dedicação e amor ao que faz. Muito Obrigado Professora.

A todos os professores do curso de especialização em endodontia da ABO/RS, por compartilharem seus vastos conhecimentos, sendo motivo de inspiração por sua dedicação e amor ao ensino da endodontia.

Aos quase irmãos, **Lênio Togni, Letícia Manique e Liliana Agostini Stys**, amigos desde a época da graduação. Obrigado pela parceria em todos os momentos bons e ruins, vocês sempre conseguiram me deixar pronto para os próximos desafios. Saibam que não conseguiria ter chegado aqui sem vocês. Valeu galera.

Aos demais amigos, por toda a ajuda e compreensão com minhas ausências devido a minha dedicação ao mestrado. Muito obrigado por serem meus amigos, todos vocês são muito importantes para mim.

Obrigado a todos que de alguma forma contribuíram com o meu crescimento profissional e pessoal que me transformaram na pessoa que sou hoje. Vida longa e próspera a todos.

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	9
INTRODUÇÃO	11
OBJETIVOS	15
2.1. Objetivo geral	15
2.2. Objetivos específicos	15
ARTIGO	16
Development of endodontic biofilms: an experimental model for the evaluation of microbial viability, structure and topography	17
DISCUSSÃO GERAL	39
CONCLUSÃO	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
ANEXO I – Ilustrações do dispositivo intrabucal utilizado durante o experimento	52
ANEXO II – Carta de aprovação Comissão Científica e Ética da Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul	54
ANEXO III – Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa	55

RESUMO

Introdução: O conhecimento sobre a microbiologia endodôntica continua sendo alvo de inúmeros estudos. Devido a isso, o presente estudo teve como objetivo avaliar características relacionadas com a viabilidade celular, topografia e estrutura do biofilme formado no interior de canais radiculares de dentes acoplados a um dispositivo intraoral.

Métodos: Foram confeccionados dispositivos intraorais inferiores, nos quais foram incluídas quatro raízes de incisivos inferiores humanos, que tiveram apenas a porção cervical da raiz exposta ao meio bucal. Um voluntário usou o dispositivo por 14 dias, em três diferentes períodos. Posteriormente, as raízes foram fragmentadas e coradas com SYTO 9 e iodeto de propídio e analisadas por microscopia confocal a laser. A viabilidade celular foi determinada qualitativamente por meio de escores com base na fluorescência dos dois canais de imagem, em cada terço do canal radicular. Em seguida, as amostras foram analisadas em microscopia eletrônica de varredura (MEV), a fim de apontar aspectos relacionados à estrutura do biofilme, topografia e densidade. A densidade do biofilme foi determinada por escores qualitativos em cada terço do canal radicular. A análise estatística foi realizada através dos testes de Mann-Whitney seguido do teste de Dunn e Kruskal-Wallis.

Resultados: A viabilidade celular foi observada em toda a extensão do canal radicular, sem diferença estatística entre os escores de microrganismos vivos e mortos. Em MEV, cocos e bacilos foram as morfologias bacterianas mais observadas, estando presentes em quase todas as amostras. No entanto, filamentos, espiroquetas e células humanas também estavam presentes. A densidade do biofilme mostrou uma concentração mais elevada no terço cervical, sendo estatisticamente diferente dos outros terços.

Conclusão: Foi possível verificar que o modelo experimental aqui apresentado, foi eficiente em reproduzir o desenvolvimento, *in situ*, de um biofilme formado em infecções endodônticas primárias *in vivo*.

Palavras-chave: Endodontia; Biofilmes Microbianos; Microscopia Eletrônica de Varredura; Microscopia Confocal a Laser; Dispositivos Intraorais.

ABSTRACT

Introduction: Knowledge of endodontic microbiology remains the subject of numerous studies. Because of this, the present study aimed to evaluate characteristics related to cell viability, topography and structure of the biofilm formed within the root canal of teeth coupled to an intraoral device.

Methods: Lower intraoral devices were made including four roots of human incisors, which have only the cervical third exposed to the oral environment. A volunteer used them for 14 days, three different times. The roots were fragmented and stained with SYTO 9 and propidium iodide and analyzed by Confocal Scanning Laser Microscopy. Viability was determined qualitatively through scores based on the fluorescence of the two image channels, in each third of the root canal. Then, the samples were analyzed in scanning electron microscopy (SEM), in order to verify aspects regarding biofilm structure, topography and density. Qualitative scores determined the biofilm density for each third of the root canal. Statistical analyses were carried out through the Kruskal–Wallis and Dunn post hoc, and Mann-Whitney tests ($p < 0.05$).

Results: Cell viability was observed throughout the length of the root canal, with no statistical difference between the scores of live and dead microorganisms. In SEM, coccus and rods were the most observed bacterial morphologies, being present in almost all samples. However, filaments, spirochetes and human cells were also observed. The density of the biofilm showed a higher concentration in the cervical third and it was statistically different from the other thirds.

Conclusions: It was possible to verify that the experimental model presented herein, was efficient in reproducing, *in situ*, morphotypes of the biofilm of *in vivo* endodontic primary infections.

Key Words: Endodontics; Microbial Biofilms; Scanning Electron Microscopy; Confocal Microscopy Laser; Intraoral Devices.

INTRODUÇÃO

Desde a descoberta da existência de microrganismos no interior dos canais radiculares e da confirmação de sua responsabilidade nos processos infecciosos relacionados a cavidade endodôntica, a endodontia tem se dedicado ao conhecimento da microbiologia endodôntica ^(1, 2).

O sistema de canais radiculares (SCR), ao se tornar contaminado, promove variadas reações no tecido pulpar, entre elas a instalação de um processo inflamatório, com a finalidade de defesa, que poderá evoluir, lenta ou rapidamente, para a morte do tecido pulpar. Todo este processo é dependente da capacidade reacional da polpa e da intensidade do agente agressor. Sendo assim, a perda da vitalidade pulpar como sequela de lesões de cárie, trauma, doença periodontal ou tratamento odontológico iatrogênico conduzirá, pela perda das defesas naturais deste tecido, à infecção endodôntica ⁽³⁾.

A infecção do canal radicular é um processo dinâmico no qual várias espécies bacterianas podem estar associadas aos diferentes estágios deste processo ⁽⁴⁻⁷⁾. Estes microrganismos são selecionados por características ambientais, tais como: a disponibilidade de nutrientes, nível de oxigênio e pH local ⁽⁸⁾. Além disso, características fenotípicas, incluindo a capacidade de penetrar a dentina, infectar áreas delgadas e crescer em biofilmes, definem a composição microbiana do microambiente endodôntico ⁽⁹⁾. Dentro deste contexto, a composição microbiana também varia de acordo com os terços radiculares ^(10, 11).

Microrganismos habitam todo o SCR, incluindo o canal principal, canais laterais, acessórios e secundários, túbulos dentinários, delta e forame apicais, regiões de reabsorções no cementárias associadas aos tecidos periapicais ⁽¹²⁾.

Espécies bacterianas podem aderir às paredes do canal radicular, aglomerar-se e formar comunidades organizadas, chamadas de biofilme; e estes, são capazes de resistir, mais que na forma planctônica, a procedimentos antimicrobianos ⁽¹³⁾. Todas estas particularidades, estruturais e microbiológicas, fazem do SCR um ecossistema extremamente complexo e de difícil reprodução laboratorial ⁽³⁾.

Com o intuito de caracterizar microrganismos, inúmeras metodologias são utilizadas, dentre elas: métodos de cultura, técnicas moleculares e técnicas de microscopia, sendo estas últimas as que podem caracterizar de forma mais satisfatória aspectos morfológicos dos biofilmes ⁽³⁾. Além disso, o uso de métodos de microscopia combinados, tais como a microscopia confocal a laser e a microscopia eletrônica de varredura, tem o potencial de melhorar a capacidade de avaliação dos biofilmes, uma vez que permite a avaliação de algumas características complementares ⁽¹⁴⁾.

Na microscopia confocal a laser, além de ser possível visualizar microrganismos no interior do SCR e túbulos dentinários, pode-se também observar se esses microrganismos estão vivos ou mortos, fornecendo informações importantes a respeito da viabilidade microbiana ⁽¹⁵⁻¹⁷⁾. Este método se baseia na ligação entre corantes fluorescentes (conjugados ou não a proteínas) e componentes celulares, ou constituintes do biofilme. E sua visualização se dá por uso de um comprimento de onda apropriado ⁽¹⁸⁾. Possui natureza não invasiva e permite o estudo de biofilmes completamente vivos e hidratados ⁽¹⁹⁾.

A microscopia eletrônica de varredura é uma importante ferramenta utilizada em Endodontia, para visualização de estruturas extremamente

pequenas como as bactérias, em especial quanto às suas características morfológicas, bem como, sua dispersão no sistema de canais radiculares. Este método fornece resultados bastante conclusivos a respeito da apresentação do biofilme no SCR e suas implicações clínicas nas áreas a ele relacionadas ^(20, 21).

Fato importante a ser considerado é que para que haja sucesso na terapia endodôntica é necessário a desinfecção do sistema de canais radiculares. Devido a essa prerrogativa, e sabendo da diversidade microbiana que pode colonizar o canal radicular, existem inúmeros estudos experimentais na área da Endodontia, que visam testar diferentes protocolos de desinfecção deste sistema de canais radiculares. Seja mediante o emprego de técnicas de instrumentação distintas ^(22, 23), seja pelo uso de substâncias irrigadoras ^(16, 17, 24) ou medicações intracanaís ^(25, 26).

No entanto, a maioria destas pesquisas, por mais sofisticadas que sejam, com métodos precisos de avaliação ou identificação da microbiota, continuam sendo realizadas a partir de determinados tipos de cepas microbianas isoladas e não em um biofilme complexo que simule as condições que podemos presenciar clinicamente ⁽³⁾. Dessa forma, os resultados de pesquisas *in vitro* que testam exclusivamente uma cepa bacteriana não podem ser extrapolados para a realidade clínica, já que a infecção endodôntica é de natureza polimicrobiana. Além disso, quando as pesquisas são realizadas a partir de uma infecção mista, raramente a mesma mimetiza, estruturalmente, a infecção endodôntica propriamente dita ⁽⁶⁾.

Com a finalidade de simular a complexidade dos microambientes orais, dispositivos intrabucais vem sendo utilizados. Eles podem nos fornecer informações a respeito da formação de biofilmes ^(27, 28), desenvolvimento de cáries

e durabilidade de materiais (29, 30). Entretanto na área da microbiologia endodôntica não há método descrito na literatura.

Por assim ser, a criação de um biofilme endodôntico em dentes previamente extraídos e acoplados a dispositivos intrabucais removíveis poderia ser uma excelente alternativa metodológica para a realização de futuras pesquisas *in vitro* na área da microbiologia endodôntica. Este modelo experimental poderá acarretar em uma reprodutibilidade da situação clínica, presente em pacientes endodônticos, para testes de eficácia e efetividade de equipamentos, bem como de materiais endodônticos, em um ambiente laboratorial.

OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Desenvolver um modelo experimental para o estudo de biofilmes endodônticos descrevendo características: morfológicas, topográficas, estruturais e de viabilidade celular microbiana em biofilmes formados em canais radiculares de dentes extraídos acoplados a dispositivos intrabucais, que foram utilizados por 14 dias.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar, através da microscopia de varredura confocal a laser, a proporcionalidade de microrganismos viáveis e não viáveis presentes nos diferentes terços dos canais radiculares;
- Observar, através da microscopia eletrônica de varredura, a morfologia microbiana no interior dos canais radiculares e túbulos dentinários, bem como descrever aspectos relacionados a densidade e estrutura do biofilme, diferenciando os terços radiculares;
- Correlacionar, os resultados de proporcionalidade obtidos na microscopia de varredura confocal a laser com os resultados de densidade do biofilme obtidos na microscopia eletrônica de varredura.

ARTIGO

Development of endodontic biofilms: an experimental model for the evaluation of microbial viability, structure and topography.

Formatado segundo as normas do periódico *Journal of Endodontics*, fator de impacto 3,12 e classificação A1 segundo a Capes.

Development of endodontic biofilms: an experimental model for the evaluation of microbial viability, structure and topography

Rafael Chies Hartmann DDS¹; Tiago André Fontoura de Melo DDS, MsC, PhD¹,
Fabiana Vieira Vier-Pelisser DDS, MsC, PhD¹; José Antonio Poli de Figueiredo
DDS, MsC, PhD¹; Francisco Montagner DDS, MsC, PhD² Roberta
Kochenborger Scarparo DDS, MsC, PhD¹

¹ Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

² Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

Corresponding Author:

Prof.^a Dr.^a Roberta Kochenborger Scarparo

Avenida Ipiranga, 6681 - Prédio 6

Porto Alegre, RS, Brazil

CEP 90619-900

+55 51 3320-3538

E-mail address: robertascarparo@pucrs.br

Morphological analysis and microbial cellular viability induced in biofilms in human extracted teeth root canals, coupled to an intraoral device

Abstract

Introduction: This study aimed to develop an intraoral device that allows endodontic biofilm formation in coupled teeth. Moreover, the present investigation points out some aspects related to the spatial analysis of biofilm viability, topography and structure. **Methods:** Three acrylic custom-made inferior devices were employed. Four prepared roots were attached on the lingual surface of each one of them, leaving only the cervical opening o root canal exposed to the oral environment. Each of the devices was used by a volunteer during 14 days, allowing the formation of endodontic biofilm. Then, all roots were removed from the device and evaluated under Scanning electron microscopy (SEM) and Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM). Microbiological features were described and differences regarding biofilm viability and density were compared among the root thirds using the Kruskal–Wallis test and Dunn *post-hoc*. Differences between viable and nonviable microorganisms into each third were assessed by Mann-Whitney test. **Results:** No differences were observed among root canal thirds using fluorescence. Similarly, no differences were observed when comparing the image channels on the same third. Microorganisms were observed in all thirds of the root canals lumen, and frequently in dentinal tubules. The predominant bacterial morphotypes were cocci and rods. Filamentous bacteria and spirochetes were observed in lower quantities. In many samples, human cells were identified,

mainly at the cervical and middle thirds. Biofilm density was higher cervically ($P < 0.05$). **Conclusions:** The experimental model presented herein was efficient in reproducing the development of the biofilm of in vivo intracanal primary infections.

Key Words: Endodontics; Microbial Biofilms; Scanning Electron Microscopy; Confocal Microscopy Laser; Intraoral Devices.

Introduction

Microorganisms play a central role in dental pulp and periapical tissues diseases ⁽¹⁻⁴⁾. In this regard, necrotic tissue acts as a substrate for bacterial nutrition, thus favoring its growth ⁽⁵⁻⁷⁾. In necrotic teeth, microorganisms inhabit the whole root canal system, adhering to the root canal walls, clustering and forming organized communities named biofilms, which are able to withstand antimicrobial procedures ^(1, 8, 9).

Root canal infection is a dynamic process in which various bacterial species may interact ^(1-3, 10, 11). These microorganisms are selected by environmental characteristics, such as nutrients availability, oxygen level and local pH ⁽¹²⁾. Moreover, phenotypic characteristics, including the ability to penetrate dentin, capacity to settle narrow areas and to grow in biofilms define the microbial composition of endodontic microenvironment ⁽¹³⁾. Within this context, bacterial composition also varies according to root canal thirds ^(14, 15).

The use of combined microscopy methods have the potential to improve biofilm evaluation ⁽¹⁶⁾, since it enables the assessment of complementary features. Confocal scanning laser microscopy (CLSM) is a nondestructive method ⁽¹⁷⁾ that allows the observation of microorganisms viability and penetration into dentinal tubules ^(18, 19). It is based on the connection between cell components and fluorescent dyes and on the adoption of appropriate wavelength ⁽²⁰⁾. On the other hand, scanning electron microscopy (SEM), has been employed to observe biofilms topography and structure ⁽²¹⁾.

Taken into account the necessity of canal disinfection to achieve endodontic success, a large number of studies have employed these methods to compare disinfection protocols, instrumentation techniques, irrigation

solutions and intracanal medications ⁽²²⁻²⁵⁾. However, most of these studies are still being conducted with certain types of isolated microbial strains and not with a structurally complex biofilm that simulates clinical conditions ⁽⁴⁾.

The attempt to simulate the complexity of infected oral microenvironments have already stimulated the development of intraoral devices applied to verify, features of biofilm formation ^(26, 27), caries development ^(28, 29) and durability of dental materials ^(30, 31). Nevertheless, in the field of endodontic microbiology there is no device described. Therefore, this study aimed to develop an intraoral device that allows endodontic biofilm development in coupled teeth. Moreover, the present investigation points out some aspects related to the spatial analysis of biofilm viability, topography and structure.

Materials and Methods

This study was approved by Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul Ethics and Research Committees (Protocol 0002/2014). An intraoral device presenting coupled extracted teeth was used by a male 32 years old volunteer, which has signed an informed consent to participate of the present research. The volunteer showed no signs of: salivary glands hypofunction, caries activity and periodontal disease.

Sample Preparation

Twelve extracted mandibular central incisors with mature apices and single straight root canals were used. Patient informed consent was obtained certifying teeth donation. The teeth crowns were sectioned with a diamond disc

(*KG Sorensen Indústria e Comércio Ltda.*, Barueri, SP, Brazil) standardizing the root length in 15 mm. Canals were prepared in the entire root length, using a #10 Pathfile (*Dentsply-Maillefer*, Ballaigues, Switzerland) under irrigation with sodium hypochlorite 2% (*VirexPlus 2%*; *Johnson Diversey Brasil Ltda*, São Paulo, SP, Brazil). Then, the root canals were filled with 17% trisodium ethylenediaminetetraacetic acid (*Biodinâmica*, Ibiporã, PR, Brazil) for 5 minutes, and then washed with 5 ml of saline solution. After that, longitudinal grooves were carved on the buccal and lingual surfaces of the roots with diamond disc (*KG Sorensen Indústria e Comércio Ltda.*, Barueri, SP, Brazil), taking care not to invade the inner part of the root canal.

Four prepared roots were attached on the lingual surface of one of the three acrylic custom-made inferior devices, according to figure 1A. To ensure that the cervical portion of the root canal would be in contact to the oral environment, only this portion of the teeth were covered with utility wax (*Artigos Odontológicos Clássico*, São Paulo, SP, Brazil) before being included into the device. After device's adjustments, the wax was removed by immersion in boiling water. Then, the devices were sterilized with Cobalt 60 Gamma radiation (25K Gy for 6 hours).

Each one of the three devices was used by the volunteer during 14 days, being removed only for feeding and oral hygiene, when devices were kept moist with the patient's saliva in boxes. Between each experimental period, the volunteer remained for 30 days without any intraoral device.

Microscopy examinations

After the experimental period, all roots were removed from the device using cutting pliers. Immediately the complete fracture of the roots was made with a chisel and hammer, providing two halves of each sample. One of the halves was selected randomly and taken for confocal analysis. The other half was discarded.

Biofilm viability

Samples were stained using a LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit 7012 (Molecular Probes, Eugene, OR) containing SYTO 9 (viable cells) and Propidium Iodide (nonviable cell), following the manufacturer's instruction. Then, images of biofilm formation were obtained with 20X and 40X lenses using Laser Scanning Microscope LSM 5 exciter (Carl Zeiss MicroImaging, Jena, Germany) at excitation wavelengths of 488 nm (SYTO 9) and 568 nm (propidium iodide), respectively. After a general survey scan of each third of the canal wall the most representative area of biofilm in the cervical, middle and apical thirds of the roots canal, in 40x magnification. Two images of each area were recorded in LSM format, one produced by green fluorescence (living cells), and other one by red fluorescence (dead cells), with possible combination of these images into one. Thereafter, a calibrated examiner analyze the images (Kappa index = 0.761) according to the following criteria (figure 1B): (1) absence of fluorescence; (2) mild fluorescence, characterized by less than 1/3 of the microscopic field presenting detectable dyes fluorescence; (3) Moderate fluorescence, characterized by the detection of dyes fluorescence

from 1/3 to 1/2 of the microscopic field; (4) Intense fluorescence, which is detected in more than 1/2 of the microscopic field.

Biofilm structure, topography and density

Soon after being observed in confocal microscopy, the roots were prepared to SEM evaluation. The samples were fixed for 7 days in 2.5% glutaraldehyde and then washed three times for 30 minutes each in 0.2 mol/L phosphate buffer and distilled water in a ratio of 1:1. The specimens were dehydrated by immersion in acetone 30%, 50%, 70%, 90%, and 100%, dried by using a critical point drier (Bal-Tec CPD 030, Fürstentum, Liechtenstein) and placed on stubs with the portion of the root canal positioned upward. Then, the samples were coated with gold-palladium approximately 200 µm of thickness (Emitech K650 Sputter Coater, London, England).

The entire canal were observed in a scanning electron microscope (XL 30; Philips, Eindhoven, Netherlands) with 500X, 2,000X, 5,000X, 10,000X, and 20,000X of magnification. Observations were made in the cervical, middle and apical thirds of the roots, focusing in the characteristics and localization of the biofilm, bacterial morphology (Cocci, Rods, Filaments and Spirochetes) and in the presence of human cells. These data were described and tabled (Table 1.).

The most representative areas of each third were recorded at 5,000x, in TIFF format at a resolution of 300 dpi. Both emission of secondary electrons (SE) and backscattering (BSE) were employed.

To determine biofilm density, images were analyzed by a blinded and calibrated evaluator (Kappa index = 0.86), according to the following criteria (figure 1C): (1) Low density - fully dispersed biofilm with many planktonic

microorganisms (2) medium density - biofilm with dense and scattered areas;
(3) High density - dense biofilm, detectable in the major part of the area.

Statistical Analysis

Differences regarding biofilm viability and density were compared among the root thirds using the Kruskal–Wallis nonparametric analysis of variance, and Dunn *post hoc*. To compare the differences between viable and nonviable microorganisms into each one of the thirds Mann-Whitney test was used. SPSS software (21.0 version, IBM Corp, Somers, NY) was employed and the significance level was set in 5%.

Results

Biofilm viability

Regarding biofilm viability, no statistically significant difference was observed among root canal thirds, neither for LIVE nor for DEAD fluorescence (figure 2). Similarly, no differences were observed when comparing these two channels on the same third (P=0.202, 0.052 and 0.066 for the cervical middle and apical third respectively).

Biofilm structure, topography and density

Microorganisms were observed in all thirds of the root canals lumen, and frequently in dentinal tubules. The predominant bacteria morphotype were cocci and rods. Filamentous bacteria and spirochetes observed in lower quantities. In many samples, human cells were identified, mainly at the cervical and middle portions of root canals (Table 1).

Biofilm density was higher in the cervical portion of the canal ($P < 0.05$). The distribution of the biofilm density on canal lumen on the three root thirds are presented on figure 3.

Discussion

The present investigation provided an experimental model that reproduces the complexity of root canal infection using human extracted roots and intrabucal devices. In this regard, SEM and confocal analysis showed the formation of a multispecies biofilm, comprised of viable and nonviable bacteria adhered to root canals walls and penetrating dentinal tubules.

These results are especially relevant if considering that the potential of substances and techniques to eliminate intracanal infection is highly affected by the endodontic microenvironment unique particularities, such as anatomical and structural features ^(21, 34). Moreover, variations of nutrients and oxygen levels lead to the formation of a biofilm presenting selected species, which is highly difficultly to reproduce in *in vitro* models ⁽¹³⁻¹⁵⁾.

Taken into account the importance of properly reproducing complex biofilms, intrabucal devices have been commonly used in other areas of dental research to validate observations on the effects of treatment protocols. On them, aspects regarding microbial viability and biofilm composition have been observed, correlating these findings to their effects on dental tissues. It was demonstrated that the biofilms formed *in situ* present similarities with those observed in clinical conditions. Thus, the proposed models enabled the evaluation of the capacity of certain substances in interfering on

demineralization and remineralization of dental tissues, and can interfere in these processes ⁽²⁶⁻³¹⁾. Up to date, no similar experimental model was described for endodontic infections. In this regard, the methodology presented herein represents a potential to be explored in the evaluation of root canal disinfection protocols. Considering the huge variation on bacterial composition in different areas of the oral cavity ⁽³²⁾, the employment of an experimental model that reproduces the endodontic microenvironment is certainly an important differential on the accuracy of studies outcomes. In this regard, the use of the developed devices by a single volunteer, as adopted herein, should reduce biofilm variability amongst specimens.

The current outcomes showed, by means of SEM evaluation, that the proposed model was able to reproduce the complexity of multispecies endodontic biofilm ^(1, 33). As a matter of fact, bacteria with variable morphologic features were observed in proportions that are similar to those presented in studies evaluating *in situ* root canal infections ^(21, 34). Moreover, the developed biofilm was also found in the in these studies through the entire length of root canal.

Cocci and rods were the more observed bacterial morphology, being present in almost all samples. This fact is in agreement with previous studies showing that there are high prevalence of Gram-negative rods and Gram-positive cocci in primary endodontic infections ^(34, 35). The presence of filaments was observed in more than half of samples, which agrees with an *in vivo* study ⁽³⁶⁾. Spirochetes were observed only in regions where biofilm were more dense and mature. Human cells were also observed, in agreement with a previous studies that evaluated necrotic teeth by SEM ⁽²¹⁾. Previous investigations have

justified their presence in necrotic canals either by their possible migration, influenced by microbial chemotactic signals ⁽³⁷⁾, or by the maintenance of residual pulp tissue.

The instrumentation of samples prior to biofilm development allowed the visualization of canals lumen in the entire root length. A denser biofilm was observed in the cervical third of canals, which might have contributed to the greater detection of dentinal tubules contamination in this portion of the root. Besides, larger diameters of dentinal tubules next to the coronal portion of teeth ⁽³⁸⁾ should have influenced on this outcome. Also regarding the higher densities of biofilm in the cervical and middle thirds of the root canal, the increased nutrient availability in this region – which was the only exposed to the oral environment – could influence the pattern of bacterial growth. Thus, biofilm formation, which requires a succession of stages, including adherence and colonization of microorganisms in planktonic form, the production of a polymeric extracellular matrix and coadhesion of other microorganisms ⁽³⁹⁾ should have progressed first on the cervical portion. Longer experimental times should be necessary to allow the formation of a mature biofilm in the apical portions of canals.

In agreement, the analysis of biofilm viability showed that, although no significant differences were observed comparing LIVE and DEAD microorganisms, there was a trend to greater amounts of viable bacteria, especially at the middle and apical thirds of the canals. This outcome can also be explained by the experimental period of 14 days, which enabled the formation of a biofilm under maturing process. As a matter of fact, a mature biofilm is featured by the equilibrium between viable and nonviable bacteria ^{(22,}

²³⁾, which was more clearly observed in the cervical portions. A previous study evaluating multi-species biofilm maturation found that biofilm achieves the highest degree of ripeness in periods between 2 and 3 weeks ⁽³⁹⁾, which was observed especially in the coronal portion of root canals.

To characterize microbial cell viability, scores of dye fluorescence intensity were used, aiming to diminish methodological limitations of confocal laser scanning microscopy and to allow obtainment of reliable results. Considering the concave shape of root canal surface and the focal distance adopted (0.20 mm), it was not possible to properly visualize the whole extension of root canal. Although these limitations were minimized by an extremely conservative root canal preparation, the quantification of fluorescence would not represent the actual status of microbial viability. On the other hand, differences between the two fluorophores employed, as well as the self-fluorescence of dentine, could affect reliable measurements.

Conclusion

Within the limitations of this study, it was possible to verify that the experimental model presented herein was efficient in reproducing the development of the biofilm of *in vivo* intracanal primary infections. The use of human roots coupled in intraoral devices should be explored in other studies for testing endodontic disinfection protocols.

References

1. Montagner F, Jacinto RC, Signoretti FG, Sanches PF, Gomes BP. Clustering behavior in microbial communities from acute endodontic infections. *Journal of endodontics* 2012;38(2):158-162.
2. Murad CF, Sassone LM, Faveri M, Hirata R, Jr., Figueiredo L, Feres M. Microbial diversity in persistent root canal infections investigated by checkerboard DNA-DNA hybridization. *Journal of endodontics* 2014;40(7):899-906.
3. Siqueira JF, Jr., Alves FR, Rocas IN. Pyrosequencing analysis of the apical root canal microbiota. *Journal of endodontics* 2011;37(11):1499-1503.
4. Siqueira JF, Jr., Rocas IN. Diversity of endodontic microbiota revisited. *Journal of dental research* 2009;88(11):969-981.
5. Matsuo T, Shirakami T, Ozaki K, Nakanishi T, Yumoto H, Ebisu S. An immunohistological study of the localization of bacteria invading root pulpal walls of teeth with periapical lesions. *Journal of endodontics* 2003;29(3):194-200.
6. Vieira AR, Siqueira JF, Jr., Ricucci D, Lopes WS. Dentinal tubule infection as the cause of recurrent disease and late endodontic treatment failure: a case report. *Journal of endodontics* 2012;38(2):250-254.
7. Soares JA, Leonardo MR, da Silva LA, Tanomaru Filho M, Ito IY. Effect of rotary instrumentation and of the association of calcium hydroxide and chlorhexidine on the antiseptics of the root canal system in dogs. *Brazilian oral research* 2006;20(2):120-126.
8. Distel JW, Hatton JF, Gillespie MJ. Biofilm formation in medicated root canals. *Journal of endodontics* 2002;28(10):689-693.
9. Nair PN, Sjogren U, Figdor D, Sundqvist G. Persistent periapical radiolucencies of root-filled human teeth, failed endodontic treatments, and periapical scars. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics* 1999;87(5):617-627.
10. Hong BY, Lee TK, Lim SM, Chang SW, Park J, Han SH, et al. Microbial analysis in primary and persistent endodontic infections by using pyrosequencing. *Journal of endodontics* 2013;39(9):1136-1140.
11. Santos AL, Siqueira JF, Jr., Rocas IN, Jesus EC, Rosado AS, Tiedje JM. Comparing the bacterial diversity of acute and chronic dental root canal infections. *PLoS one* 2011;6(11):e28088.
12. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjogren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-

treatment. Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics 1998;85(1):86-93.

13. Figdor D, Sundqvist G. A big role for the very small--understanding the endodontic microbial flora. Australian dental journal 2007;52(1 Suppl):S38-51.

14. Alves FR, Siqueira JF, Jr., Carmo FL, Santos AL, Peixoto RS, Rocas IN, et al. Bacterial community profiling of cryogenically ground samples from the apical and coronal root segments of teeth with apical periodontitis. Journal of endodontics 2009;35(4):486-492.

15. Siqueira JF, Jr., Rocas IN, Paiva SS, Guimaraes-Pinto T, Magalhaes KM, Lima KC. Bacteriologic investigation of the effects of sodium hypochlorite and chlorhexidine during the endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics 2007;104(1):122-130.

16. Schaudinn C, Carr G, Gorur A, Jaramillo D, Costerton JW, Webster P. Imaging of endodontic biofilms by combined microscopy (FISH/cLSM - SEM). Journal of microscopy 2009;235(2):124-127.

17. Neu TR, Woelfl S, Lawrence JR. Three-dimensional differentiation of photo-autotrophic biofilm constituents by multi-channel laser scanning microscopy (single-photon and two-photon excitation). Journal of microbiological methods 2004;56(2):161-172.

18. Du T, Wang Z, Shen Y, Ma J, Cao Y, Haapasalo M. Effect of long-term exposure to endodontic disinfecting solutions on young and old *Enterococcus faecalis* biofilms in dentin canals. Journal of endodontics 2014;40(4):509-514.

19. Niazi S, Al-Ali W, Patel S, Foschi F, Mannocci F. Synergistic effect of 2% Chlorhexidine combined with proteolytic enzymes on biofilm disruption and killing. International endodontic journal 2014.

20. Arnold T, Grossmann K, Baumann N. Uranium speciation in biofilms studied by laser fluorescence techniques. Analytical and bioanalytical chemistry 2010;396(5):1641-1653.

21. Baldasso FE, Sturmer CP, Luisi SB, Petruzzi MN, Scarparo RK, De Figueiredo JA. Microflora associated with primary endodontic infections: correlations among SEM evaluation, clinical features, and radiographic findings. Microscopy research and technique 2012;75(11):1557-1563.

22. Ma J, Wang Z, Shen Y, Haapasalo M. A new noninvasive model to study the effectiveness of dentin disinfection by using confocal laser scanning microscopy. Journal of endodontics 2011;37(10):1380-1385.

23. Hohnscheidt GL, Bottcher DE, Fatturi Parolo CC, Montagner F, Grecca FS. Response of *E. faecalis* biofilms to different associations of auxiliary

substances during root canal preparation: a confocal laser microscopy analysis. *Microscopy research and technique* 2013;76(6):658-662.

24. Cheng X, Guan S, Lu H, Zhao C, Chen X, Li N, et al. Evaluation of the bactericidal effect of Nd:YAG, Er:YAG, Er,Cr:YSGG laser radiation, and antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) in experimentally infected root canals. *Lasers in surgery and medicine* 2012;44(10):824-831.

25. Saber Sel D, El-Hady SA. Development of an intracanal mature *Enterococcus faecalis* biofilm and its susceptibility to some antimicrobial intracanal medications; an in vitro study. *European journal of dentistry* 2012;6(1):43-50.

26. Kensche A, Basche S, Bowen WH, Hannig M, Hannig C. Fluorescence microscopic visualization of non cellular components during initial bioadhesion in situ. *Archives of oral biology* 2013;58(10):1271-1281.

27. Arweiler NB, Netuschil L, Beier D, Grunert S, Heumann C, Altenburger MJ, et al. Action of food preservatives on 14-days dental biofilm formation, biofilm vitality and biofilm-derived enamel demineralisation in situ. *Clinical oral investigations* 2013.

28. Hara AT, Turssi CP, Ando M, Gonzalez-Cabezas C, Zero DT, Rodrigues AL, Jr., et al. Influence of fluoride-releasing restorative material on root dentine secondary caries in situ. *Caries research* 2006;40(5):435-439.

29. Barata JS, Casagrande L, Pitoni CM, De Araujo FB, Garcia-Godoy F, Groisman S. Influence of gaps in adhesive restorations in the development of secondary caries lesions: an in situ evaluation. *American journal of dentistry* 2012;25(4):244-248.

30. Hass V, Luque-Martinez I, Sabino NB, Loguercio AD, Reis A. Prolonged exposure times of one-step self-etch adhesives on adhesive properties and durability of dentine bonds. *Journal of dentistry* 2012;40(12):1090-1102.

31. Gracco A, Mazzoli A, Favoni O, Conti C, Ferraris P, Tosi G, et al. Short-term chemical and physical changes in invisalign appliances. *Australian orthodontic journal* 2009;25(1):34-40.

32. Zaura E, Keijser BJ, Huse SM, Crielaard W. Defining the healthy "core microbiome" of oral microbial communities. *BMC microbiology* 2009;9:259.

33. Siqueira JF, Jr., Rocas IN, Rosado AS. Investigation of bacterial communities associated with asymptomatic and symptomatic endodontic infections by denaturing gradient gel electrophoresis fingerprinting approach. *Oral microbiology and immunology* 2004;19(6):363-370.

34. Chu FC, Tsang CS, Chow TW, Samaranayake LP. Identification of cultivable microorganisms from primary endodontic infections with exposed and unexposed pulp space. *Journal of endodontics* 2005;31(6):424-429.

35. Siqueira JF, Jr., Rocas IN, Souto R, de Uzeda M, Colombo AP. Actinomyces species, streptococci, and Enterococcus faecalis in primary root canal infections. *Journal of endodontics* 2002;28(3):168-172.
36. Ricucci D, Siqueira JF, Jr. Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. *Journal of endodontics* 2010;36(8):1277-1288.
37. Bergmans L, Moisiadis P, Van Meerbeek B, Quirynen M, Lambrechts P. Microscopic observation of bacteria: review highlighting the use of environmental SEM. *International endodontic journal* 2005;38(11):775-788.
38. Mjor IA, Nordahl I. The density and branching of dentinal tubules in human teeth. *Archives of oral biology* 1996;41(5):401-412.
39. Stojicic S, Shen Y, Haapasalo M. Effect of the source of biofilm bacteria, level of biofilm maturation, and type of disinfecting agent on the susceptibility of biofilm bacteria to antibacterial agents. *Journal of endodontics* 2013;39(4):473-477.

TABLE 1. SEM evaluation of cervical, middle, and apical thirds of the samples

SAMPLE	Root Portion	Microorganisms			Human Cells
	Third	Canal Lumen	Dentinal Tubules	Morphology	
1	Cervical	+	0	C - R - F	-
	Middle	+	+	C - R - F	-
	Apical	+	0	C	-
2	Cervical	+	+	C - R - F	-
	Middle	+	+	C - R - F	-
	Apical	+	+	C	-
3	Cervical	+	+	C - R - F	+
	Middle	+	+	C - R	-
	Apical	+	+	C - R	-
4	Cervical	+	+	C - R - F - S	+
	Middle	+	+	C - R - F - S	+
	Apical	+	0	C - R - F	-
5	Cervical	+	+	C - R - F - S	+
	Middle	+	+	C - R - F - S	+
	Apical	+	+	C - R - F - S	+
6	Cervical	+	+	C - R - F - S	+
	Middle	+	-	C - R	-
	Apical	+	-	C - R	-
7	Cervical	+	+	C - R - F	+
	Middle	+	0	C - R	+
	Apical	+	0	C - R	-
8	Cervical	+	+	C - R - F - S	+
	Middle	+	+	C - R	+
	Apical	+	-	C - R	+
9	Cervical	+	+	C - R - F - S	+
	Middle	+	+	C - R - F - S	+
	Apical	+	-	C - R	+
10	Cervical	+	+	C - R - F - S	+
	Middle	+	+	C - R - F - S	+
	Apical	+	0	C - R - F - S	+
11	Cervical	+	+	C - R - F - S	+
	Middle	+	+	C - R - F	+
	Apical	+	+	C - R	-
12	Cervical	+	+	C - R - F - S	+
	Middle	+	+	C - R - F	+
	Apical	+	+	C - R - F	-

+: presence; -: absence; 0: not visible area; C: Cocci; R: Rods; F: Filaments; S: Spirochetes;

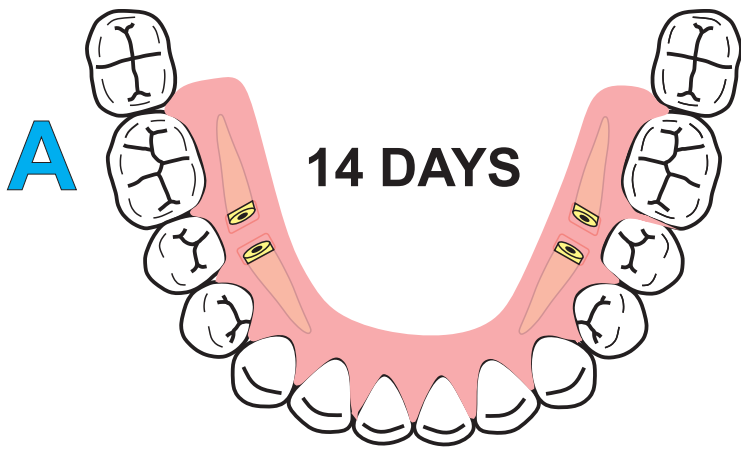
Figure Legends

Figure 1. (A) Schematic drawing of the intraoral device. (B) Scores used for the two image channels, in CLSM. (C) Scores used in the characterization of biofilm density, in SEM.

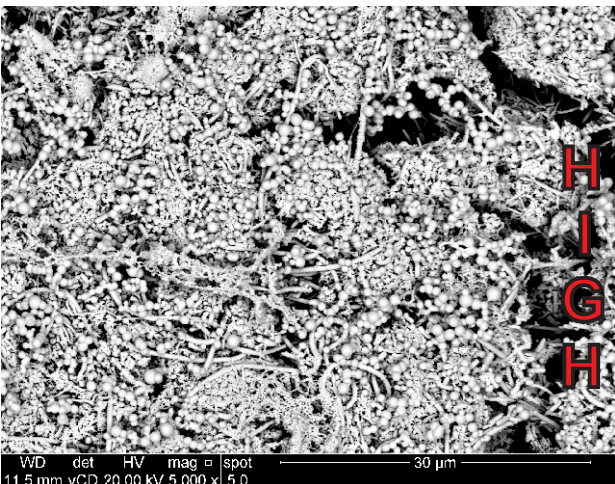
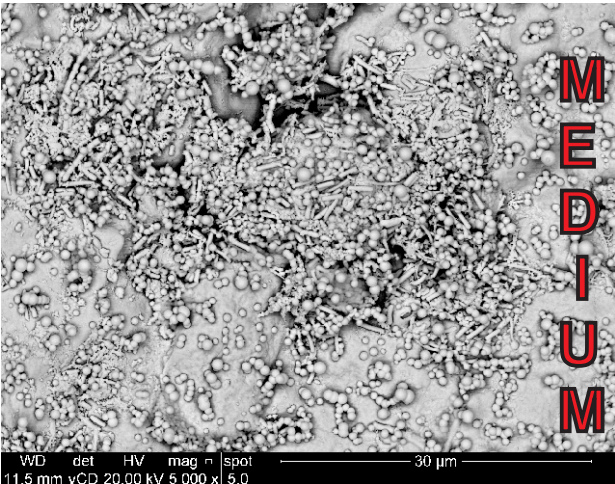
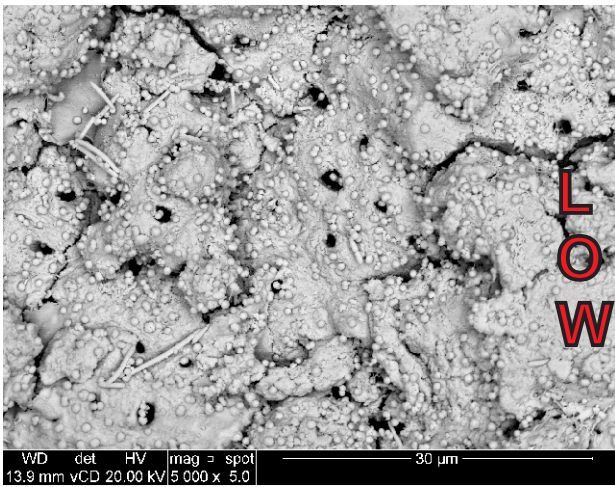
Figure 2. (A) Representative images of cell viability in different thirds of the root canal in the two image channels. (B) Graphical scores presented in the two channels in different thirds of the root canal. There is no statistically significant difference ($p < 0.05$).

Figure 3. (A) Graphic representation of the scores concerning biofilm density of the different thirds of the root canal. The cervical third was statistically different compared to the others ($p < 0.05$). (B) Illustrative images, in increase of 20,000X, bacterial morphotypes and human cells observed. (C) Representative images of the most prevalent densities in each third of the root canal: cervical, middle and apical.

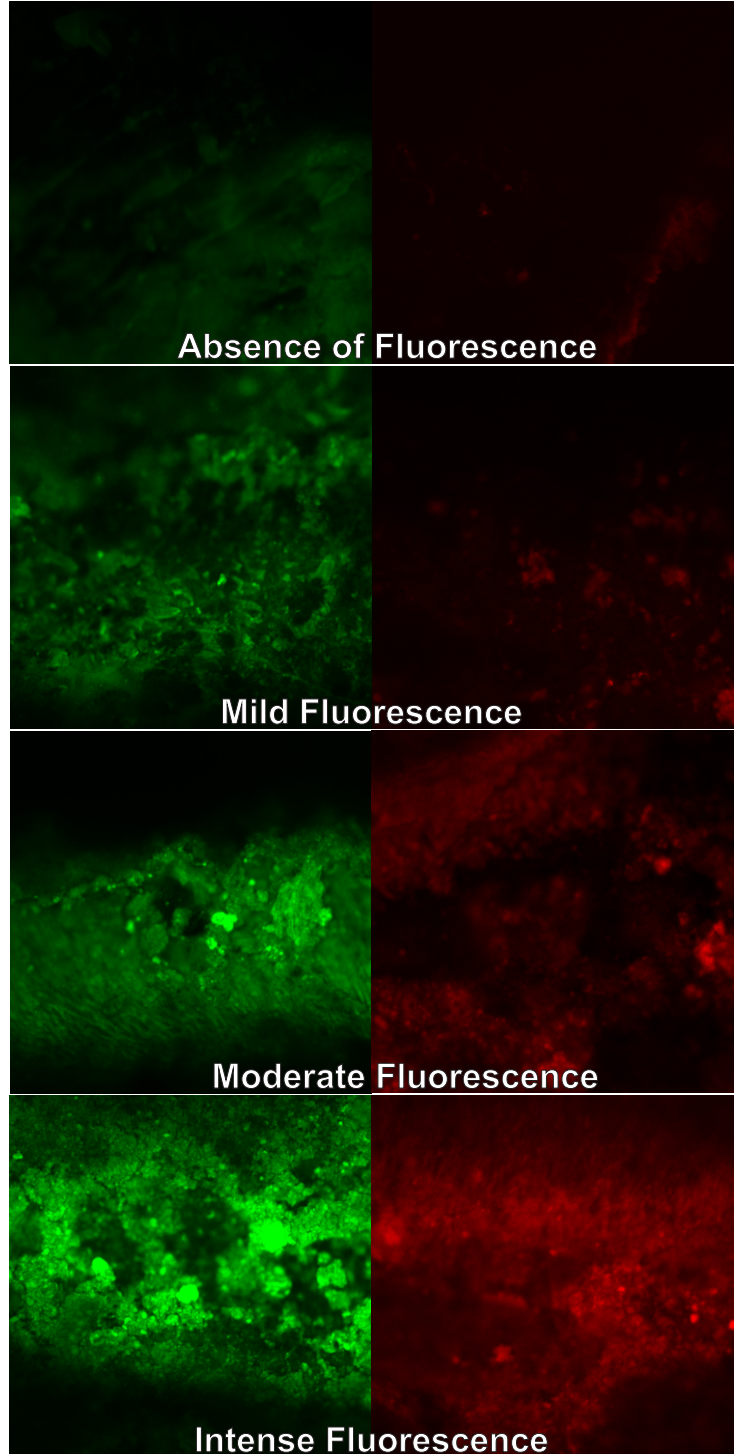
Figure 1



BIOFILM DENSITY SCORES



BIOFILM VIABILITY SCORES



C

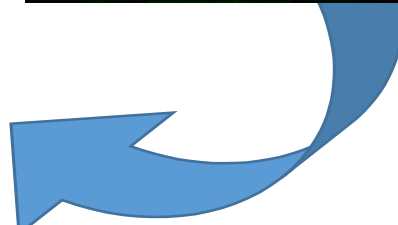
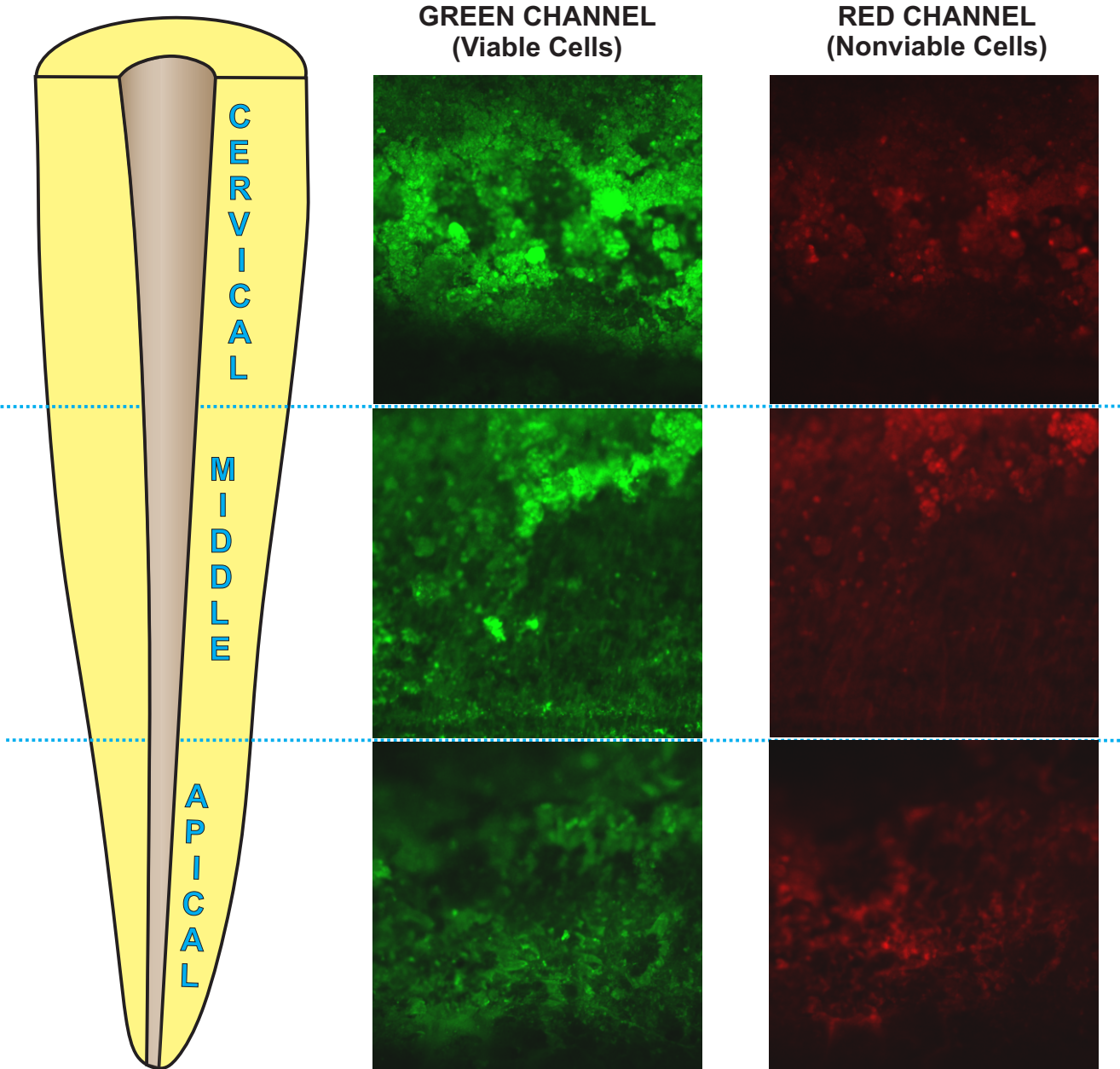


Figure 2

A



B

Confocal Live/Dead

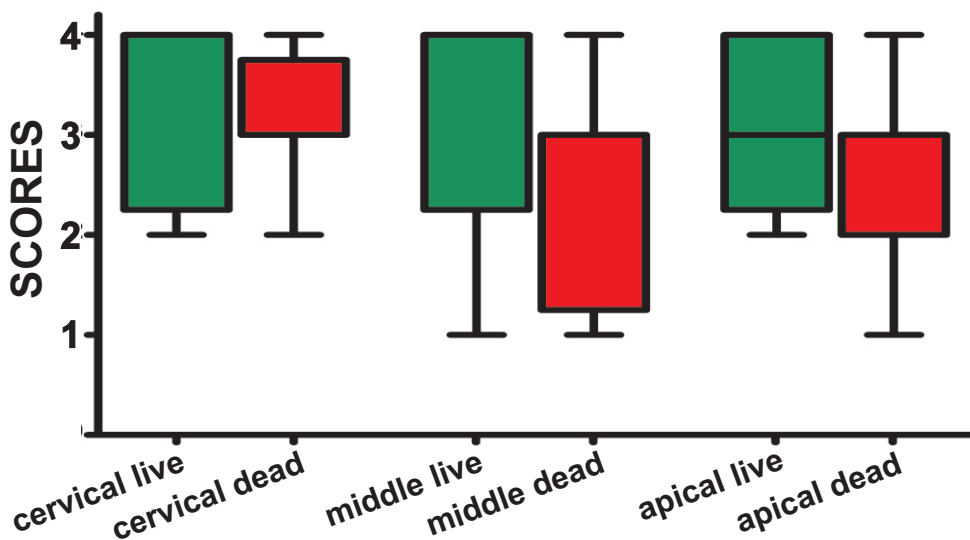
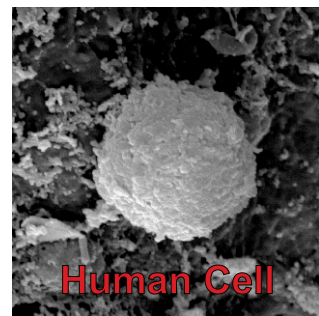
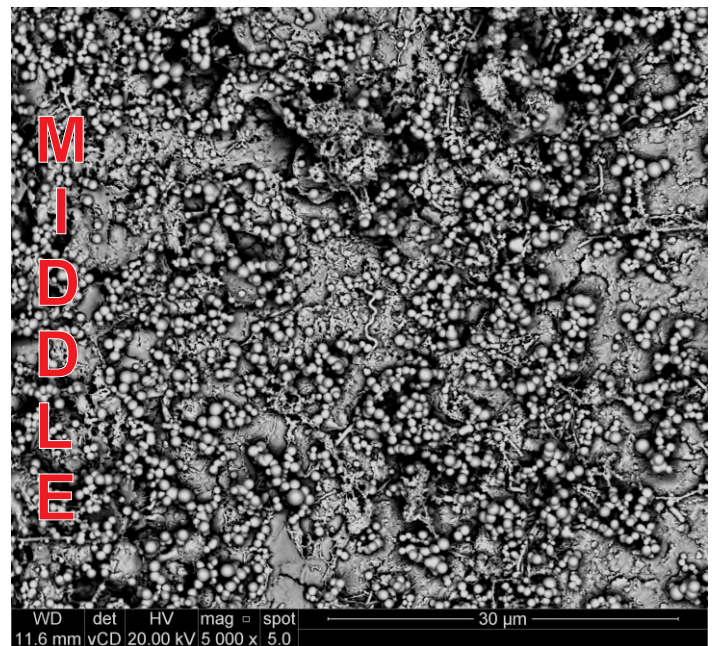
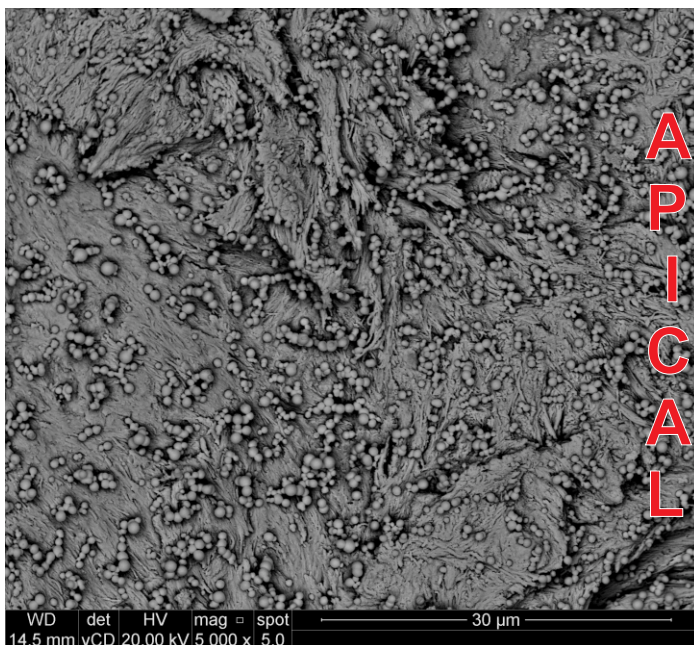
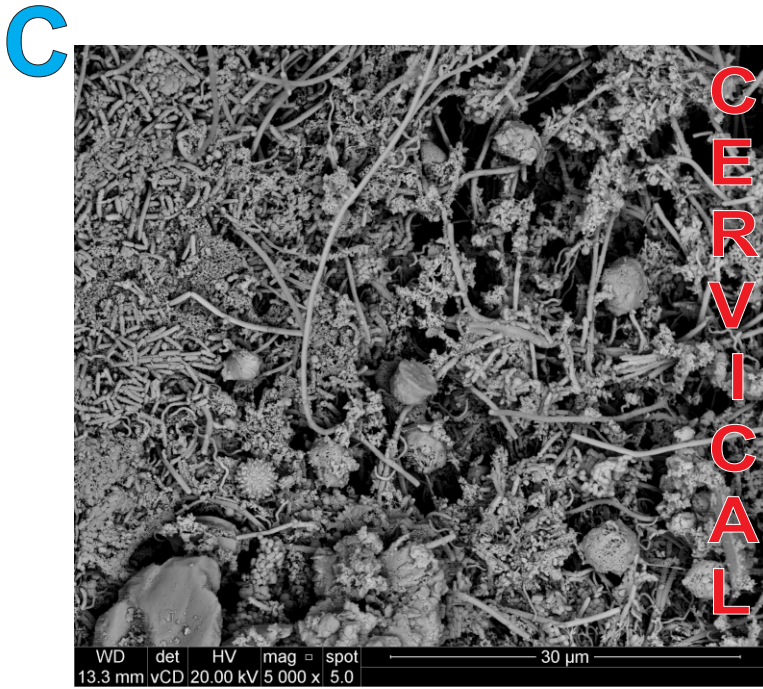
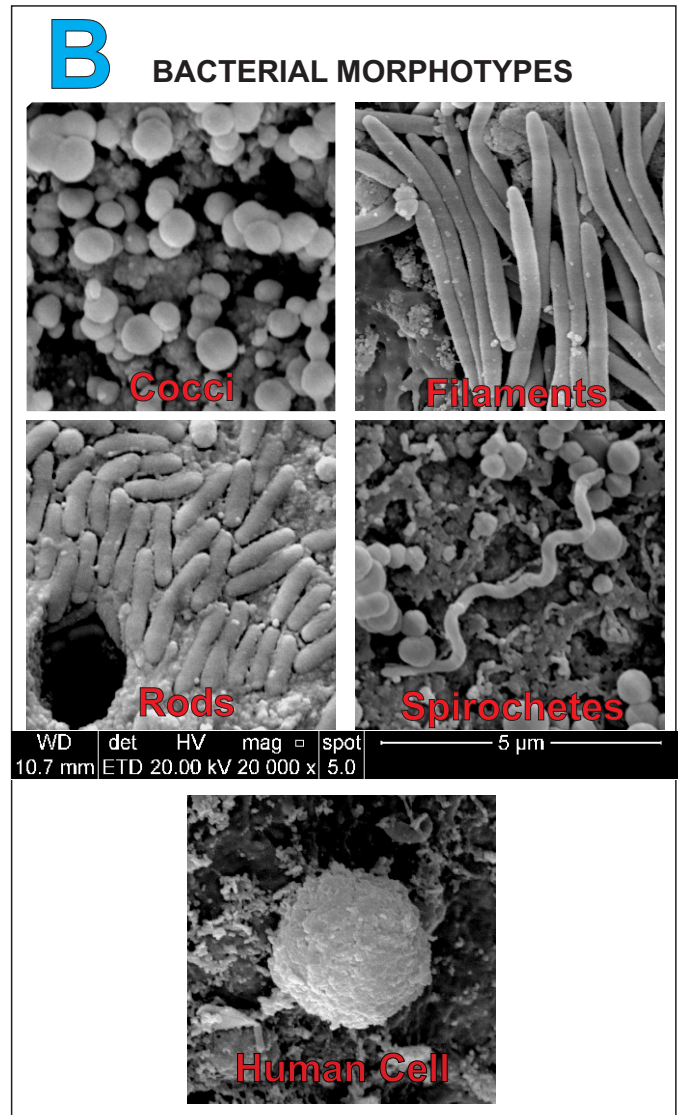
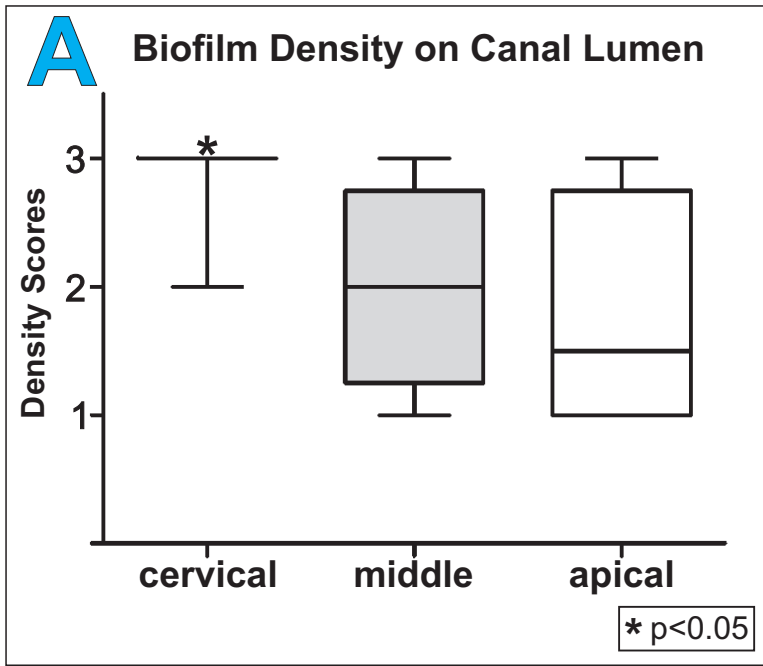


Figure 3



DISCUSSÃO GERAL

O presente estudo desenvolveu um modelo experimental que reproduz a complexidade da infecção do canal radicular utilizando raízes de dentes humanos extraídos e acoplados a dispositivos intrabucais. As análises em microscopia eletrônica de varredura e microscopia confocal a laser mostraram a formação de um biofilme composto por múltiplas espécies, com microrganismos viáveis e não viáveis, aderidos às paredes dos canais radiculares e penetrando nos túbulos dentinários, em toda a extensão do canal radicular.

Estes resultados são especialmente relevantes quando se considera que substâncias e técnicas utilizadas no intuito de eliminar a infecção microbiana dos canais radiculares é diretamente afetada por particularidades, únicas, do microambiente endodôntico, tais como, características anatômicas e estruturais (1, 2). Além disso, devido a variação de nutrientes e de oxigênio no canal radicular, existe uma seletividade bacteriana que torna o biofilme endodôntico especialmente difícil de ser reproduzido e contendo características similares às situações clínicas, em estudos *in vitro* (3-5).

Levando em conta a importância de se reproduzir corretamente biofilmes complexos, dispositivos intrabucais têm sido comumente utilizados em outras áreas de pesquisa odontológica para validar observações sobre os efeitos de protocolos de tratamento. Sobre eles, foram observados aspectos relativos à viabilidade microbiana e composição do biofilme, correlacionando esses achados aos seus efeitos sobre os tecidos dentais. Demonstraram que o biofilme formado *in situ* apresenta efeitos semelhantes àqueles observados em condições clínicas.

Assim, os modelos propostos permitiram a avaliação da capacidade de algumas substâncias em interferir nos processos de desmineralização e remineralização dos tecidos dentários, e que fatores podem interferir nestes processos ⁽⁶⁻¹¹⁾.

Até o presente momento, nenhum modelo experimental semelhante foi descrito para infecções endodônticas. A este respeito, a metodologia aqui apresentada representa um potencial a ser explorado na avaliação de protocolos de desinfecção do canal radicular. Considerando a enorme variação na composição bacteriana em diferentes áreas da cavidade oral ⁽¹²⁾, o emprego de um modelo experimental que reproduza o microambiente endodôntico é certamente um diferencial importante para precisão dos resultados de estudos. Sabendo disso, com a intenção de reduzir a variabilidade da flora oral inicial na formação de biofilme endodôntico, o experimento foi feito em apenas um voluntário, que usou o dispositivo em três momentos distintos, com 30 dias de intervalo entre os períodos experimentais.

Em estudos precedentes que avaliaram canais radiculares de dentes extraídos que apresentavam lesões periapicais em microscopia eletrônica de varredura (MEV), puderam observar a presença de biofilme multi-espécies complexo formado em toda a extensão do canal radicular ^(1, 13). Em concordância com estes, no presente estudo, foram observados no lúmen do canal radicular, em todos os terços das amostras, contaminação microbiana de morfotipos variados. No entanto, quando observados os túbulos dentinários esta contaminação não esteve presente em todas as amostras, geralmente estando ausente nos terços médio e apical, onde biofilme apresentou-se menos denso.

Os morfotipos bacterianos mais observados foram cocos e bacilos, estando presentes em quase todas as amostras. Este fato está de acordo com

estudos anteriores que mostram que há alta prevalência de bacilos e cocos nas infecções endodônticas primárias. Sendo os Bacilos Gram-negativos e cocos Gram-positivos as espécies de bactérias mais prevalentes ^(2, 14). Foi observada a presença de microrganismos filamentosos em mais da metade das amostras. Isto está de acordo com um estudo *in vivo*, que observou este tipo bacteriano na maioria dos casos de necrose pulpar. Espiroquetas foram observadas apenas em regiões em que o biofilme se apresentou mais denso e com características de maior maturidade ⁽¹⁵⁾.

Foi observada a presença de células humanas nos canais radiculares, o que foi verificado em um estudo anterior que constatou a presença destas células em casos de necrose quando observados em MEV ⁽¹⁾. Este fato pode ter ocorrido devido a duas situações: células advindas da cavidade oral tenham migrado para o interior dos canais, através de sinais quimiotáticos ⁽¹⁶⁾; remanescentes celulares do tecido pulpar que não foram removidos durante a preparação, já que esta, foi extremamente conservadora (Pathfile # 10).

No que diz respeito à densidade do biofilme pode ser observado maiores densidades nos terços médio e cervical do canal radicular. Isto pode estar relacionado com a maior disponibilidade de nutrientes nesta região, já que o único acesso do canal radicular ao meio externo era a cervical, pois o ápice radicular estava coberto por resina acrílica. Outro fator a ser considerado é a complexidade da formação de biofilmes em superfícies estáticas, que requer uma sucessão de etapas, incluindo: a adesão e colonização de microrganismos em forma planctônicas, a produção de uma matriz extracelular polimérica e coadesão de outros microrganismos ⁽¹⁷⁾. Ou seja, as porções mais cervicais foram infectadas primeiramente, havendo mais tempo para a maturação do biofilme.

A microscopia confocal é usada em vários estudos em endodontia, pois usando fluoróforos específicos é possível visualizar a viabilidade celular. Através deste método pode – se avaliar não só os aspectos morfológicos das bactérias, mas também se essas bactérias estão vivas ^(18, 19). Como mencionado anteriormente, os biofilmes são estruturas dinâmicas que estão continuamente mudando, por isso, existe uma sobreposição constante de microrganismos ⁽¹⁷⁾, sendo em biofilmes maduros, as quantidades de células microbianas viáveis e não viáveis semelhantes ^(18, 19). Isso foi observado no presente estudo, pois, quando comparados os dois canais de imagem no mesmo terço da raiz, não houve diferença estatisticamente significativa nos índices indicados. No presente estudo os dispositivos foram utilizados por 14 dias. Em um estudo anterior que avaliou o grau de maturação de biofilmes multi-espécies foi demonstrado que entre 2 e 3 semanas o biofilme atinge o maior grau de maturação ⁽¹⁷⁾. Portanto, provavelmente, os biofilmes formados no dispositivo intraoral estavam em processo de maturação, principalmente nos terços cervical e médio. Devido a isso, são necessários mais estudos sobre o tempo de maturação do biofilme através desta técnica. Especialmente, para aumentar o grau de maturação no terço apical.

Para caracterizar a viabilidade das células microbianas por microscopia confocal a laser foram usados escores devido a algumas limitações do método: 1) a distância focal do microscópio (0,20 mm), não havia possibilidade de visualizar com exatidão toda extensão do canal radicular devido a sua concavidade. Essa limitação foi minimizada através da realização do preparo endodôntico extremamente conservador dos canais radiculares; 2) a diferença de fluorescência dos dois marcadores e a autofluorescência da dentina, de modo

que os métodos de medição através de valores dos pixels da imagem não representariam corretamente a situação apresentada.

Novos estudos são necessários a fim de reforçar a metodologia apresentada nesta pesquisa, já que aponta para perspectivas muito promissoras no que diz respeito a novos protocolos de desinfecção do sistema de canais radiculares. Variações de tempo e condições locais podem enriquecer o arsenal de possibilidades e apontar para perguntas mais específicas que possam ser respondidas com este modelo.

CONCLUSÃO

Dentro das limitações deste estudo, pode ser observado que a formação de biofilmes dentro dos canais radiculares, que foram utilizados nos dispositivos intrabucais apresentou complexidade semelhante aos apresentados em estudos *in vivo*. Além disso, estes biofilmes apresentaram viabilidade celular microbiana em todos os terços dos canais radiculares com valores que indicam que o biofilme formado tinha uma composição complexa. Portanto, este novo modelo experimental poderá auxiliar a elucidar inúmeras questões referentes aos processos de desinfecção do sistema de canais radiculares em estudos futuros.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The Effects of Surgical Exposures of Dental Pulps in Germ-Free and Conventional Laboratory Rats. *Oral surgery, oral medicine, and oral pathology* 1965;20:340-349.
2. Moller AJ, Fabricius L, Dahlen G, Ohman AE, Heyden G. Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. *Scandinavian journal of dental research* 1981;89(6):475-484.
3. Siqueira JF, Jr., Rocas IN. Diversity of endodontic microbiota revisited. *Journal of dental research* 2009;88(11):969-981.
4. Montagner F, Jacinto RC, Signoretti FG, Sanches PF, Gomes BP. Clustering behavior in microbial communities from acute endodontic infections. *Journal of endodontics* 2012;38(2):158-162.
5. Murad CF, Sassone LM, Faveri M, Hirata R, Jr., Figueiredo L, Feres M. Microbial diversity in persistent root canal infections investigated by checkerboard DNA-DNA hybridization. *Journal of endodontics* 2014;40(7):899-906.
6. Siqueira JF, Jr., Alves FR, Rocas IN. Pyrosequencing analysis of the apical root canal microbiota. *Journal of endodontics* 2011;37(11):1499-1503.

7. Santos AL, Siqueira JF, Jr., Rocas IN, Jesus EC, Rosado AS, Tiedje JM. Comparing the bacterial diversity of acute and chronic dental root canal infections. *PloS one* 2011;6(11):e28088.
8. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjogren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics* 1998;85(1):86-93.
9. Figdor D, Sundqvist G. A big role for the very small--understanding the endodontic microbial flora. *Australian dental journal* 2007;52(1 Suppl):S38-51.
10. Alves FR, Siqueira JF, Jr., Carmo FL, Santos AL, Peixoto RS, Rocas IN, et al. Bacterial community profiling of cryogenically ground samples from the apical and coronal root segments of teeth with apical periodontitis. *Journal of endodontics* 2009;35(4):486-492.
11. Siqueira JF, Jr., Rocas IN, Paiva SS, Guimaraes-Pinto T, Magalhaes KM, Lima KC. Bacteriologic investigation of the effects of sodium hypochlorite and chlorhexidine during the endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics* 2007;104(1):122-130.

12. Matsuo T, Shirakami T, Ozaki K, Nakanishi T, Yumoto H, Ebisu S. An immunohistological study of the localization of bacteria invading root pulpal walls of teeth with periapical lesions. *Journal of endodontics* 2003;29(3):194-200.
13. Nair PN, Sjogren U, Figdor D, Sundqvist G. Persistent periapical radiolucencies of root-filled human teeth, failed endodontic treatments, and periapical scars. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics* 1999;87(5):617-627.
14. Schaudinn C, Carr G, Gorur A, Jaramillo D, Costerton JW, Webster P. Imaging of endodontic biofilms by combined microscopy (FISH/cLSM - SEM). *Journal of microscopy* 2009;235(2):124-127.
15. Ma J, Wang Z, Shen Y, Haapasalo M. A new noninvasive model to study the effectiveness of dentin disinfection by using confocal laser scanning microscopy. *Journal of endodontics* 2011;37(10):1380-1385.
16. Wang Z, Shen Y, Haapasalo M. Effectiveness of endodontic disinfecting solutions against young and old *Enterococcus faecalis* biofilms in dentin canals. *Journal of endodontics* 2012;38(10):1376-1379.
17. Wang Z, Shen Y, Ma J, Haapasalo M. The effect of detergents on the antibacterial activity of disinfecting solutions in dentin. *Journal of endodontics* 2012;38(7):948-953.

18. Arnold T, Grossmann K, Baumann N. Uranium speciation in biofilms studied by laser fluorescence techniques. *Analytical and bioanalytical chemistry* 2010;396(5):1641-1653.
19. Neu TR, Lawrence JR. Investigation of microbial biofilm structure by laser scanning microscopy. *Advances in biochemical engineering/biotechnology* 2014;146:1-51.
20. Baldasso FE, Sturmer CP, Luisi SB, Petruzzi MN, Scarparo RK, De Figueiredo JA. Microflora associated with primary endodontic infections: correlations among SEM evaluation, clinical features, and radiographic findings. *Microscopy research and technique* 2012;75(11):1557-1563.
21. Estrela C, Sydney GB, Figueiredo JA, Estrela CR. A model system to study antimicrobial strategies in endodontic biofilms. *Journal of applied oral science : revista FOB* 2009;17(2):87-91.
22. Iqbal MK, Floratos S, Hsu YK, Karabucak B. An in vitro comparison of Profile GT and GTX nickel-titanium rotary instruments in apical transportation and length control in mandibular molar. *Journal of endodontics* 2010;36(2):302-304.
23. Marinho AC, Martinho FC, Zaia AA, Ferraz CC, Gomes BP. Influence of the apical enlargement size on the endotoxin level reduction of dental root canals. *Journal of applied oral science : revista FOB* 2012;20(6):661-666.

24. Bago I, Plecko V, Gabric Panduric D, Schauperl Z, Baraba A, Anic I. Antimicrobial efficacy of a high-power diode laser, photo-activated disinfection, conventional and sonic activated irrigation during root canal treatment. *International endodontic journal* 2013;46(4):339-347.
25. Rocas IN, Siqueira JF, Jr. Antibiotic resistance genes in anaerobic bacteria isolated from primary dental root canal infections. *Anaerobe* 2012;18(6):576-580.
26. Taneja S, Kumari M. Use of triple antibiotic paste in the treatment of large periradicular lesions. *Journal of investigative and clinical dentistry* 2012;3(1):72-76.
27. Arweiler NB, Netuschil L, Beier D, Grunert S, Heumann C, Altenburger MJ, et al. Action of food preservatives on 14-days dental biofilm formation, biofilm vitality and biofilm-derived enamel demineralisation in situ. *Clinical oral investigations* 2013.
28. Kensche A, Basche S, Bowen WH, Hannig M, Hannig C. Fluorescence microscopic visualization of non cellular components during initial bioadhesion in situ. *Archives of oral biology* 2013;58(10):1271-1281.
29. Barata JS, Casagrande L, Pitoni CM, De Araujo FB, Garcia-Godoy F, Groismann S. Influence of gaps in adhesive restorations in the development of secondary caries lesions: an in situ evaluation. *American journal of dentistry* 2012;25(4):244-248.

30. Hass V, Luque-Martinez I, Sabino NB, Loguercio AD, Reis A. Prolonged exposure times of one-step self-etch adhesives on adhesive properties and durability of dentine bonds. *Journal of dentistry* 2012;40(12):1090-1102.
31. Chu FC, Tsang CS, Chow TW, Samaranayake LP. Identification of cultivable microorganisms from primary endodontic infections with exposed and unexposed pulp space. *Journal of endodontics* 2005;31(6):424-429.
32. Gracco A, Mazzoli A, Favoni O, Conti C, Ferraris P, Tosi G, et al. Short-term chemical and physical changes in invisalign appliances. *Australian orthodontic journal* 2009;25(1):34-40.
33. Hara AT, Turssi CP, Ando M, Gonzalez-Cabezas C, Zero DT, Rodrigues AL, Jr., et al. Influence of fluoride-releasing restorative material on root dentine secondary caries in situ. *Caries research* 2006;40(5):435-439.
34. Zaura E, Keijser BJ, Huse SM, Crielaard W. Defining the healthy "core microbiome" of oral microbial communities. *BMC microbiology* 2009;9:259.
35. Richardson N, Mordan NJ, Figueiredo JA, Ng YL, Gulabivala K. Microflora in teeth associated with apical periodontitis: a methodological observational study comparing two protocols and three microscopy techniques. *International endodontic journal* 2009;42(10):908-921.

36. Siqueira JF, Jr., Rocas IN, Souto R, de Uzeda M, Colombo AP. Actinomyces species, streptococci, and Enterococcus faecalis in primary root canal infections. Journal of endodontics 2002;28(3):168-172.
37. Ricucci D, Siqueira JF, Jr. Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. Journal of endodontics 2010;36(8):1277-1288.
38. Bergmans L, Moisiadis P, Van Meerbeek B, Quirynen M, Lambrechts P. Microscopic observation of bacteria: review highlighting the use of environmental SEM. International endodontic journal 2005;38(11):775-788.
39. Stojicic S, Shen Y, Haapasalo M. Effect of the source of biofilm bacteria, level of biofilm maturation, and type of disinfecting agent on the susceptibility of biofilm bacteria to antibacterial agents. Journal of endodontics 2013;39(4):473-477.
40. Hofscheidt GL, Bottcher DE, Fatturi Parolo CC, Montagner F, Grecca FS. Response of E. faecalis biofilms to different associations of auxiliary substances during root canal preparation: a confocal laser microscopy analysis. Microscopy research and technique 2013;76(6):658-662.

ANEXO - Ilustrações do dispositivo intrabucal utilizado durante o experimento.

Figura 01 - Imagem ilustrativa do dispositivo intrabucal.

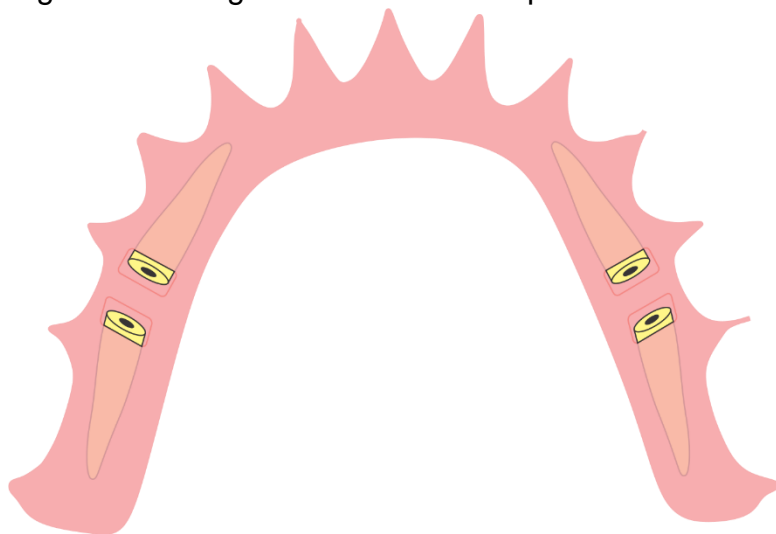


Figura 02 - Imagem ilustrativa do dispositivo intrabucal em 3 dimensões.

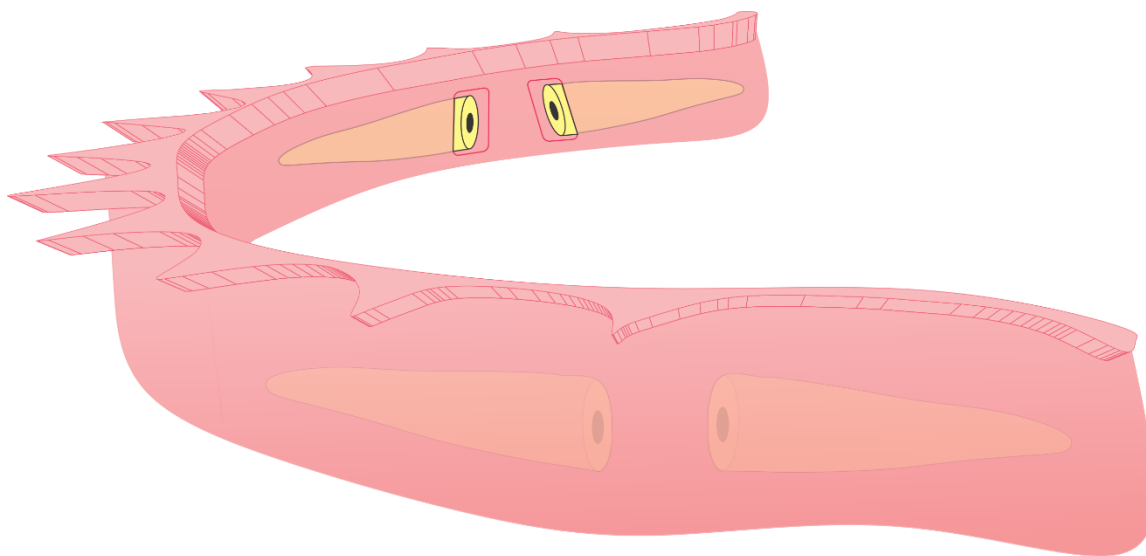
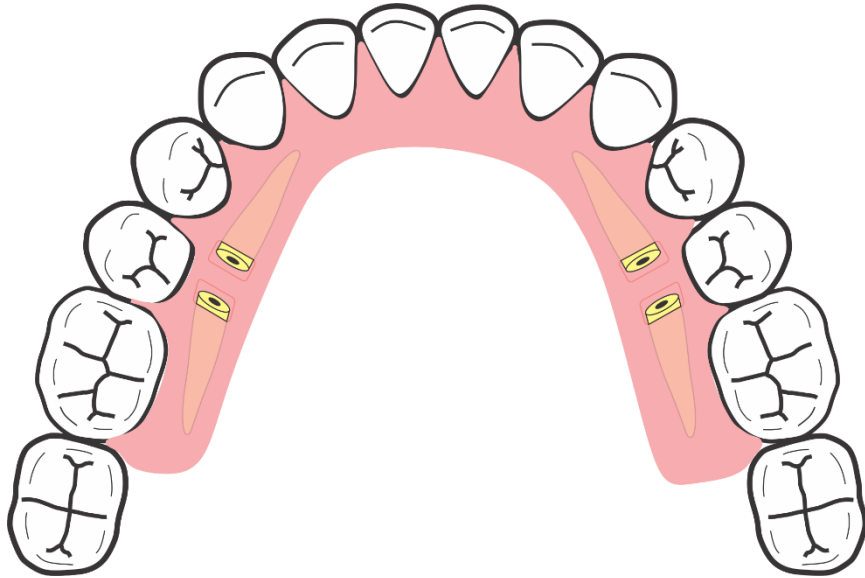


Figura 03 – Imagem ilustrativa como o dispositivo intrabucal foi utilizado na arcada inferior, em uma visão oclusal.





Comissão Científica e de Ética
Faculdade da Odontologia da PUCRS

Porto Alegre 15 de abril de 2014

O Projeto de: Dissertação

Protocolado sob nº: 0002/14

Intitulado: Análise Morfológica e da Viabilidade Celular Microbiana em Biofilmes Induzidos em Canais Radiculares de Dentes Humanos Extraídos, Acoplados a um Dispositivo Intrabucal.

Pesquisador Responsável: Profa. Dra. Fabiana Vieira Vier Pelisser

Pesquisadores Associados: Rafael Chies Hartmann

Nível: Dissertação / Mestrado

Foi **aprovado** pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da PUCRS em *Quinze de Abril de Dois Mil e Quatorze*

Este projeto deverá ser imediatamente encaminhado ao CEP/PUCRS.

Profa. Dra. Luciane Macedo Menezes
Coordenadora da Comissão Científica e de Ética da
Faculdade de Odontologia da PUCRS

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ANÁLISE MORFOLÓGICA E DA VIABILIDADE CELULAR MICROBIANA EM BIOFILMES INDUZIDOS EM CANAIS RADICULARES DE DENTES HUMANOS EXTRAÍDOS, ACOPLADOS A UM DISPOSITIVO INTRABUCAL

Pesquisador: José Antonio poli de Figueiredo

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 39481314.0.0000.5336

Instituição Proponente: UNIAO BRASILEIRA DE EDUCACAO E ASSISTENCIA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 937.606

Data da Relatoria: 12/02/2015

Apresentação do Projeto:

Projeto de dissertação do Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia, área de Endodontia. Neste estudo serão analisadas ex vivo a morfologia e a viabilidade microbiana do biofilme intracanal formado em dentes acoplados a dispositivos intrabuciais removíveis.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Geral

- Descrever características morfológicas e a viabilidade celular microbiana em biofilmes formados em canais radiculares de dentes extraídos acoplados a dispositivos intrabuciais.

Objetivos Específicos

- Observar, através da microscopia eletrônica de varredura, a morfologia microbiana no interior dos canais radiculares e túbulos dentinários, bem como caracterizá-la fenotipicamente, diferenciando os terços radiculares.

- Avaliar, através da microscopia confocal a laser, a viabilidade dos microrganismos presente no interior dos canais e túbulos dentinários, assim como a espessura do biofilme formado nos diferentes terços da raiz.

Endereço: Av.Ipiranga, 6681, prédio 40, sala 505

Bairro: Partenon

CEP: 90.619-900

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3320-3345

Fax: (51)3320-3345

E-mail: cep@puhrs.br

Continuação do Parecer: 937.606

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos

Desconfortos e possíveis lesões em mucosa nos casos de má adaptação dos aparelhos. Entretanto, durante a fase de instalação dos aparelhos intrabucais e no decorrer do experimento, qualquer desconforto relatado pelo voluntário será diagnosticado e solucionado, para que a causa da irritação seja prontamente eliminada, evitando assim, as possíveis lesões nas mucosas.

Benefícios

O presente projeto traz consigo a perspectiva de poder avaliar in situ o biofilme microbiano formado sob a superfície dentária e assim criarmos um novo método de reprodutibilidade da colonização microbiana previamente à execução de estudos in vitro na área de microbiologia oral.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Serão convidados a participar deste estudo 5 voluntários, de ambos os sexos e com idade entre 18 e 35 anos.

Servirão como critérios para exclusão dos pacientes, voluntárias em período de gestação, voluntários com atividade de cárie, gengivite ou doença periodontal, que estão fazendo uso de aparelhos ortodônticos ou clareamento dentário, apresentando patologias locais ou sistêmicas, que fazem uso de qualquer tipo de medicação ou que não concordem com os termos da pesquisa.

Serão utilizados 10 incisivos inferiores humanos unirradiculares com canal único, obtidos junto a consultórios odontológicos particulares, os quais foram extraídos por motivos diversos.

Os dentes terão as coroas seccionadas e os canais radiculares preparados endodonticamente pela técnica escalonada, com irrigação de hipoclorito de sódio 2,5%, seguida de irrigação final com EDTA 17%, sendo então, esterilizados com radiação Gama com fonte de Cobalto 60.

Posteriormente, serão fixados na face lingual, na região de pré-molares, de dispositivos intrabucais confeccionados em acrílico. Os voluntários utilizarão o dispositivo por quatorze dias, apenas o removendo para se alimentarem e realizar a higiene bucal.

Após o período experimental, as amostras dentárias serão removidas dos dispositivos intrabucais, e as raízes serão seccionadas em seu longo eixo. As duas hemisseções de cada elemento dental serão observadas em microscopia confocal, e posteriormente, em microscopia eletrônica de

Endereço: Av.Ipiranga, 6681, prédio 40, sala 505

Bairro: Partenon

CEP: 90.619-900

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3320-3345

Fax: (51)3320-3345

E-mail: cep@puhrs.br

Continuação do Parecer: 937.606

varredura. Serão analisados nas imagens em três dimensões, aspectos referentes à viabilidade, à densidade e espessura do biofilme nos diferentes terços do canal principal, assim como no interior dos túbulos dentinários. Após análise em microscopia de varredura confocal a laser, os fragmentos serão analisados em MEV. A avaliação será feita por dois observadores experientes, que farão uma avaliação descritiva dos aspectos morfológicos bacterianos encontrados (cocos, espiroquetas, bacilos, hifas, filamentos), conforme o estudo de Baldasso et al. (2012).

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os seguintes termos foram apresentados:

- Currículo Lattes dos pesquisadores.
- Orçamento
- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para doação dos dentes.
- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para participação no estudo.
- Folha de rosto da plataforma Brasil.
- Carta de aprovação da Comissão Científica da FO.
- Carta de autorização do responsável pelo Centro de Microscopia e Microanálises.
- Carta de autorização do responsável pelo Laboratório de Endodontia.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Endereço: Av. Ipiranga, 6681, prédio 40, sala 505

Bairro: Partenon

CEP: 90.619-900

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3320-3345

Fax: (51)3320-3345

E-mail: cep@puhrs.br

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE
CATÓLICA DO RIO GRANDE
DO SUL - PUC/RS



Continuação do Parecer: 937.606

PORTO ALEGRE, 23 de Janeiro de 2015

Assinado por:
Rodolfo Herberto Schneider
(Coordenador)

Endereço: Av.Ipiranga, 6681, prédio 40, sala 505

Bairro: Partenon

CEP: 90.619-900

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3320-3345

Fax: (51)3320-3345

E-mail: cep@puhrs.br