

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA – NÍVEL MESTRADO
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO CLÍNICA ODONTOLÓGICA – ENDODONTIA

ALEXANDER POMPERMAYER JARDINE

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE CIMENTOS QUE CONTÊM SILICATO DE
CÁLCIO EM DENTINA INFECTADA POR BIOFILME MULTI-ESPÉCIES: UM
ESTUDO EM MICROSCOPIA CONFOCAL À LASER

Porto Alegre

2016

ALEXANDER POMPERMAYER JARDINE

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE CIMENTOS QUE CONTÊM SILICATO DE
CÁLCIO EM DENTINA INFECTADA POR BIOFILME MULTI-ESPÉCIES: UM
ESTUDO EM MICROSCOPIA CONFOCAL À LASER

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como pré-requisito final para a obtenção do título de Mestre em Clínica Odontológica - Endodontia.

Linha de Pesquisa: Biomateriais e Técnicas Terapêuticas em Odontologia.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Patrícia Maria Poli Kopper Móra

Porto Alegre

2016

CIP - Catalogação na Publicação

Jardine, Alexander Pompermayer

Atividade antimicrobiana de cimentos que contêm silicato de cálcio em dentina infectada por biofilme multi-espécies: um estudo em microscopia confocal à laser. / Alexander Pompermayer Jardine. -- 2016. 46 f.

Orientadora: Patrícia Maria Poli Kopper.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Odontologia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. Cimento de silicato. 2. Microscopia confocal. 3. Endodontia. I. Kopper, Patrícia Maria Poli, orient. II. Título.

Dedico este trabalho à minha mãe e colega de profissão, Inês Regina Pompermayer. Obrigado pelo apoio incondicional que tens me dado durante a minha caminhada na Odontologia. Tu és o espelho de ser humano e profissional que eu desejo ser.

À minha namorada, Bibiana Franzen Matte, companheira profissional, acadêmica e de vida.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, na pessoa do Reitor Prof. Dr. Rui Vicente Oppermann, por proporcionar a minha formação como Cirurgião Dentista e mestre em Clínica Odontológica, com ênfase em Endodontia.

À Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, na pessoa do Diretor Prof. Dr. Pantelis Varvak Rados, sou grato pelo acolhimento e conhecimento oferecido desde 2010, quando iniciei a minha formação como Cirurgião Dentista.

Ao Programa de Pós Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, representado pelo professor coordenador Dr. Cassiano Rösing, obrigado por me proporcionar o apoio necessário à minha formação como mestre.

À Prof^ª. Dr^ª. Patrícia Maria Poli Kopper Móra, orientadora deste trabalho, obrigado pelo apoio, confiança e compreensão que guiam a nossa parceria há 5 anos. Obrigado por me ensinar à pensar Odontologia e Endodontia. Sempre serei grato.

Aos mestres, professores de Endodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Prof. Régis Burmeister dos Santos, Prof. João Ferlini Filho, , Prof^ª. Fabiana Grecca Villela, Prof. Marcus Vinícius Reis Só, Prof^ª. Patrícia Kopper, Prof. Francisco Montagner, Prof^ª. Simone Bonato Luisi, Prof^ª. Renata Grazziotin e Prof^ª. Roberta Scarparo, por transmitirem conhecimento e estarem sempre presentes na minha formação.

Ao cirurgião-dentista e mestrando em Endodontia, Ramiro Martins Quintana, pelo companheirismo e auxílio neste trabalho e em tantos outros momentos. Tu fizeste essa trajetória mais fácil e alegre.

Aos alunos do Programa de Pós Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em especial a Camila Grock, Júlia Iglesias, Lucas Pinheiro, Luciana Luz e Ramiro Martins Quintana, por permitirem a troca de conhecimento e, assim, o crescimento profissional de todos nós.

Aos alunos de pós-graduação voluntários deste trabalho. Sem a colaboração de vocês, não seria possível chegar até aqui.

Ao Laboratório de Bioquímica e Microbiologia (LABIM) da Faculdade de Odontologia, seus professores – representados pela Prof^ª. Dr^ª. Marisa Maltz – e sua servidora técnica, Luisa Mercado, pela permissão de uso das dependências e equipamentos e apoio durante a execução deste trabalho.

Ao Centro de Microscopia e Microanálise (CMM) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, por dar suporte e permitir o uso do Microscópio Confocal à Laser e do Microscópio Eletrônico de Varredura necessários à realização deste trabalho.

À Fundação de Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), do Ministério da Educação (MEC), por suporte financeiro durante o período de mestrado.

RESUMO

JARDINE, Alexander Pompermayer. **Atividade antimicrobiana de cimentos que contêm silicato de cálcio em dentina infectada por biofilme multi-espécies: um estudo em microscopia confocal à laser.** 2016. 46 f. Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, área de concentração Clínica Odontológica/Endodontia – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016.

Este estudo teve como objetivo avaliar, em microscopia confocal à laser (CLSM), a ação antimicrobiana do Neo MTA Plus, do Biodentine e do MTA Angelus, utilizando um modelo de biofilme multi-espécies microcosmo, e descrever a morfologia dos microrganismos encontrados no biofilme, através da análise em microscópio eletrônico de varredura (MEV). Cinquenta e seis blocos de dentina, confeccionados a partir de raízes de dentes humanos, foram cortados em dimensões de 5 x 4 x 4 mm, limpos e esterilizados. Dois blocos foram utilizados para o controle do processo de esterilização. Os demais 54 foram fixados em placas de Hawley confeccionadas para 6 voluntários. Cada voluntário utilizou uma placa por 72 horas. Após esse período, os blocos foram mantidos em poços de cultura celular, contendo BHI, em estufa à 37°C, por um período de 21 dias. Ao final do processo de maturação do biofilme, as amostras foram divididas aleatoriamente em 5 grupos, conforme os cimentos a serem testados e o método de análise: Neo MTA Plus (n=12), Biodentine (n=12), MTA Angelus (n=12), controle negativo (n=12) e grupo para análise em MEV (n=6). A seguir, os cimentos foram colocados em contato com o biofilme dos blocos dos grupos-teste e os conjuntos (bloco + cimento) ou os blocos do grupo controle e para análise em MEV foram recolocados em poços de cultura contendo BHI, onde permaneceram por 7 dias à 37°C. A análise em CLSM foi realizada nos blocos de dentina e nos cimentos, separadamente. A análise em MEV foi realizada nas seis amostras do grupo correspondente. Todos os grupos apresentaram mais de 50% de bactérias viáveis. O Neo MTA Plus foi o único material a apresentar diferença significativa quando comparado ao grupo controle negativo (P=.0379). A análise em MEV mostrou um biofilme composto por bactérias de forma circular e de bastonetes, circundadas por matriz extra-celular. Em conclusão, todos os grupos apresentaram bactérias viáveis e o Neo MTA Plus teve a maior ação antimicrobiana.

Palavras-chave: Endodontia; Microscopia confocal; Cimento de silicato.

ABSTRACT

JARDINE, Alexander Pompermayer. **Antimicrobial effect of calcium silicate-based materials in dentin infected by multispecies biofilm: a confocal laser scanning microscopy study.** 2016. 46 p. Dissertation presented to the Postgraduate Program in Dentistry of the Federal University of Rio Grande do Sul, area of concentration: Dental Clinic/Endodontics – Faculty of Dentistry, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016.

This study aimed to assess, by confocal laser scanning microscopy (CLSM), the antimicrobial effect of Neo MTA Plus, Biodentine and MTA Angelus, using a microcosmo biofilm model, and to describe the microorganisms morphology, by SEM. Fifty-six dentin blocks were made from human teeth roots, cut in a size 5 x 4 x 4 mm, cleaned and sterilized. Two blocks were used to sterilization control. The others 54 blocks were fixed in Hawley retainers made for 6 volunteers that used it for 72h. After this period, they were placed in wells with BHI for 21 days, at 37°C. At the end of the biofilm growth, the samples were randomly divided in 5 groups: Neo MTA Plus (n=12), Biodentine (n=12), MTA Angelus (n=12), negative control (n=12), and SEM analysis (n=6). The cements were placed in contact with the blocks of the tested groups. All samples were replaced in wells with BHI by 7 days at 37°C. CLSM analysis evaluated the dentin blocks and cements isolated. SEM observation were performed in the six samples of the respective group. All groups presented a level of viable bacteria higher than 50%. Neo MTA Plus was the only one that showed significant difference from the negative control group (P=.0379). SEM analysis showed a biofilm composed of spherical and rod-shaped bacteria surrounded by extracellular matrix. All groups presented viable bacteria and Neo MTA Plus had the highest antimicrobial effect.

Keywords: Endodontics; Microscopy, confocal; Silicate cement.

SUMÁRIO

1	APRESENTAÇÃO.....	7
2	INTRODUÇÃO.....	8
3	ARTIGO CIENTÍFICO.....	16
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	32
	REFERÊNCIAS.....	33
	ANEXO A – PARECER DA COMPESQ.....	37
	ANEXO B – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP/UFRGS.....	38
	ANEXO C – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	41
	ANEXO D – METODOLOGIA DETALHADA.....	43

1 APRESENTAÇÃO

A presente dissertação teve como foco de estudo avaliar a atividade antimicrobiana de três cimentos de uso endodôntico que contêm silicato de cálcio em sua composição (Neo MTA Plus, Biodentine e MTA Angelus) em contato com dentina humana infectada por biofilme oral multi-espécies.

Esta dissertação de mestrado está estruturada da seguinte maneira:

- Introdução: enfatizando os pontos principais deste estudo;
- Artigo: o desenvolvimento do trabalho está apresentado na forma de artigo científico de periódico em inglês, a ser enviado para publicação na revista *Journal of Endodontics*, fator de impacto 2.904 (Qualis A1, CAPES);
- Considerações finais.

2 INTRODUÇÃO

Dentes com polpa vital, inflamada ou não, possuem mecanismos de defesa que impedem a instalação de uma infecção no sistema de canais radiculares. Por outro lado, dentes com polpa necrosada não apresentam tais mecanismos de defesa e, inevitavelmente, necessitarão de tratamento endodôntico, uma vez que a infecção dos canais radiculares certamente ocorrerá. Considerando esses fatores, o tratamento endodôntico deve limpar, desinfetar, modelar e preencher com materiais obturadores o sistema de canais radiculares (SIQUEIRA JÚNIOR, 2001)

Contudo, a alta complexidade anatômica do sistema de canais radiculares contribui para a permanência de microrganismos viáveis em seu interior, mesmo após o preparo químico-mecânico ser cuidadosamente executado, podendo ocorrer casos de insucesso após a conclusão do tratamento (WADA et al., 1998; NAIR et al., 2005). As reinfecções podem ocorrer devido a sobrevivência de bactérias remanescentes nos túbulos dentinários, canais acessórios e istmos, onde o biofilme pode ser formado e, nestas localizações, as bactérias podem estar protegidas das substâncias desinfetantes e do efeito antibacteriano direto de cimentos endodônticos aplicados no canal radicular (WANG et al., 2014). Dessa forma, o tratamento endodôntico deve apresentar uma limpeza químico-mecânica e uma obturação adequadas, respectivamente, com soluções irrigadoras e cimentos que apresentem propriedades antimicrobianas entre outros fatores.

Os microrganismos encontrados nas infecções endodônticas são diversos, sendo a maior parte composta por anaeróbios estritos e menor parte por anaeróbios facultativos (SIQUEIRA JÚNIOR, 2002). Os microrganismos anaeróbios estritos estão relacionados com os casos de infecções endodônticas primárias e são facilmente combatidos com o preparo químico-mecânico do sistema de canais radiculares. Dentre os microrganismos anaeróbios estritos se destacam: membros dos gêneros *Porphyromonas* e *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Eubacterium* e *Peptostreptococcus*. Anaeróbios facultativos, por outro lado, estão fortemente relacionados aos casos de infecção secundária ou persistente – quando se destacam bactérias como *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sanguinis*. Além disso, *Candida albicans* – um fungo, em geral, presente na cavidade oral – é frequentemente

isolado a partir do canal radicular (MORSE, 1981; SELTZER; FARBER, 1994; SIQUEIRA JÚNIOR et al., 2000; SIQUEIRA JÚNIOR et al., 2001).

A colonização bacteriana do sistema de canais radiculares se encontra, em sua maioria, em suspensão na forma planctônica na luz do canal radicular. Contudo, grandes aglomerações de células bacterianas são encontradas aderidas as paredes do sistema de canais radiculares, formando um conjunto de microrganismos e matriz extra-celular, semelhantes a biofilmes multi-camadas e multi-espécies (NAIR, 1987; SIQUEIRA JÚNIOR; RÔÇAS; LOPES, 2002). Os microrganismos organizados em biofilmes apresentam uma maior resistência contra antissépticos e antibióticos e comumente são encontrados em dentes com lesão periapical (SIQUEIRA JÚNIOR; RÔÇAS; LOPES, 2002; FARIA-JÚNIOR et al., 2013). Este biofilme pode estar presente nas paredes dentinárias, nos túbulos dentinários, em acidentes anatômicos do sistema de canais e na superfície radicular apical externa, tornando a sua eliminação extremamente difícil durante o tratamento do canal radicular (SIQUEIRA JÚNIOR; RÔÇAS; LOPES, 2002). Ricucci et al. (2010), indo ao encontro de outros achados da literatura (SIQUEIRA JÚNIOR; RÔÇAS; LOPES, 2002), demonstrou que a presença de biofilme bacteriano no interior do sistema de canais radiculares está relacionada com o estabelecimento de periodontite apical, sendo esta relação descrita tanto para casos de infecção primária quanto infecção secundária ou persistente.

O preenchimento do sistema de canais radiculares deve impedir a reinfecção, nos casos de necrose pulpar, ou a infecção do referido sistema, nos casos em que havia vitalidade pulpar e, conseqüentemente, ausência de microrganismos (KOPPER et al., 2007; WANG et al., 2014). A obturação visa proporcionar o aprisionamento da microbiota que porventura tenha sobrevivido ao preparo químico-mecânico, associado ou não à medicação intracanal, e impedir ou retardar a recontaminação do canal. Portanto, é importante que a obturação preencha tridimensionalmente o canal, ocupando o espaço previamente preenchido pelo tecido pulpar, deixando confinados os possíveis microrganismos resistentes às etapas anteriores do preparo do canal, sem substrato para manter seu metabolismo. Além disso, vêm sendo preconizado que sejam valorizadas as propriedades antimicrobianas dos cimentos endodônticos, podendo, essas, favorecer o sucesso do tratamento endodôntico (DUARTE et al., 1997; WANG et al., 2014).

Os cimentos endodônticos também são amplamente utilizados em outros procedimentos, além da obturação, como: capeamento pulpar, selamento de perfurações radiculares, apicificação da raiz dentária e retro-obturação do canal radicular.

O capeamento pulpar direto tem como objetivo proteger a superfície pulpar exposta e, assim, manter a vitalidade e preservar a fun o biológica da polpa dentária. Diferentes tipos de cimentos endodônticos vêm sendo utilizados nesses casos, dentre eles os cimentos que cont m silicato de cálcio. Esses materiais, possuindo propriedades antimicrobianas, podem auxiliar na elimina o de microrganismos residuais, localizados próximos do local da exposi o, e influenciar no resultado do tratamento (POGGIO et al., 2014).

Nos casos de perfura o radicular, o prognóstico do dente depende de sua localiza o, de seu tamanho e do tempo decorrido entre a ocorrência da perfura o e seu selamento, além da presença ou não de contamina o bacteriana no local em que ocorreu. Dessa forma, a a o antimicrobiana   fundamental para um melhor prognóstico do procedimento e, portanto, para a manuten o do dente (SELTZER et al., 1970; SINAI, 1977; HAMAMOTO et al., 1989).

Dentes com forma o radicular incompleta e com necrose pulpar, devido a trauma ou lesão de cárie, têm a deposi o de dentina interrompida. Por esse motivo, o tratamento endodôntico deve, além de desinfetar, modelar e preencher o sistema de canais radiculares, permitir a forma o de tecido mineralizado na região apical, caracterizando a apicifica o. Para que isso ocorra, além de permitir a forma o de tecido mineralizado e ser biocompatível, os cimentos endodônticos indicados para os casos de apicifica o devem ter a o antimicrobiana, agindo sobre microrganismos remanescentes no interior do sistema de canais (NAYAK; HASAN, 2014).

Grande parte das falhas de tratamentos endodônticos estão relacionados com a inadequada desinfec o do sistema de canais radiculares e a permanência, no seu interior, de microrganismos e suas toxinas. Assim, quando o tratamento endodôntico não-cirúrgico   insuficiente para alcançar o sucesso,   necessário lançar mão do tratamento cirúrgico, onde realiza-se apicetomia e retro-obtura o do dente. Para retro-obtura o, os cimentos que apresentam silicato de cálcio em sua composi o são uma alternativa (HIREMATH et al., 2015; CECI et al., 2015).

A ação antibacteriana de soluções irrigadoras já foi investigada contra comunidades microbianas específicas (ORDINOLA-ZAPATA et al., 2012; BÖTTCHER et al., 2015). Entretanto, a ação direta de cimentos endodônticos em contato com biofilmes orais ainda não foi extensivamente estudada. Entendendo que a atividade antimicrobiana dos cimentos de uso endodôntico, utilizados nas diversas aplicações clínicas, pode auxiliar na diminuição da microbiota responsável pela infecção residual (RODRIGUES et al., 2012), pode-se afirmar que estes devem, além de ser biocompatíveis, possuir efeito antimicrobiano. Tal propriedade pode prevenir a colonização bacteriana e a formação de um biofilme na interface entre os materiais, diminuindo o risco de reinfecções dos canais radiculares (HEYDER et al., 2013; POGGIO et al., 2014).

O MTA é um pó branco ou cinza de partículas hidrofílicas finas que endurecem na presença de umidade. O MTA é composto, principalmente, por silicatos tri (3CaO.SiO₂) e dicálcio (2CaO.SiO₂). O processo de endurecimento do MTA é descrito como uma reação de hidratação de seus silicatos, sendo o Ca₂SiO₄ o responsável pelo desenvolvimento da resistência mecânica. Neste processo, ocorre a dissociação de íons a partir do material anidro que induz a formação do hidrato de silicato de cálcio (C-S-H) e hidróxido de cálcio (CH), resultando na cristalização dos hidratos com uma estrutura emaranhada que confere resistência ao material (CAMILLERI, 2008).

O MTA (mineral trioxide aggregate) foi inicialmente indicado como material retro-obturador e posteriormente utilizado também em outras situações clínicas, como: capeamento pulpar, pulpotomia, apicificação, reparo de perfurações radiculares e material obturador de canal radicular. A expansão das indicações do MTA tem sua base na ótima qualidade de suas propriedades físicas e biológicas, dentre as quais vale destacar a sua excelente capacidade de selamento e sua expressiva bioatividade (TORABINEJAD et al., 1995; SCARPARO et al., 2010). Essas características tornaram o MTA um dos materiais mais indicado como cimento reparador. Contudo, o MTA apresenta uma alta dificuldade para manipulação e inserção do material dentro da cavidade a ser selada. Buscando superar essa limitação, novos materiais semelhantes ao MTA vêm sendo desenvolvidos e lançados no mercado.

O MTA Angelus (Angelus, Londrina, PR, Brasil) é um cimento hidrofílico que contém silicato de cálcio, sendo semelhante ao MTA original. Este material apresenta características de bioatividade e biocompatibilidade e tem sido usado atualmente com sucesso em capeamento pulpar direto (TORABINEJAD; PARIROKH, 2010). Sua composição é de 80% de cimento Portland e 20% de óxido de bismuto, além de conter maiores quantidades carbonato de cálcio e silicato de cálcio do que o MTA. Esse material apresenta tempo de presa inicial após 10 minutos e final após 15 minutos. Após a espatulação com água, o pH do material tem um valor 10 por até 3 horas, quando há a estabilização do pH em um valor 12 (TORABINEJAD et al., 1995). O MTA Angelus, portanto, produz um pH levemente maior e uma maior liberação de cálcio do que o MTA, sendo essa alcalinidade um dos fatores relacionados a sua satisfatória ação antimicrobiana (TORABINEJAD et al., 1995; PARIROKH; TORABINEJAD, 2010).

Recentemente, foi lançado comercialmente o Neo MTA Plus (Avalon Biomed Inc., Bradenton, Flórida, Estados Unidos), composto silicato de tricálcio, silicato de dicálcio, sílica e óxido de tântalo. Este material apresenta as mesmas aplicações do MTA e composição semelhante ao MTA Plus (Avalon Biomed Inc., Bradenton, Flórida, Estados Unidos). Contudo, há a substituição do óxido de bismuto do MTA Plus pelo óxido de tântalo no Neo MTA Plus, o que inibe o processo de pigmentação do dente após o contato do material com hipoclorito de sódio (CAMILLERI, 2015). Atualmente, poucos estudos envolveram o uso de Neo MTA Plus, porém o MTA Plus demonstrou a capacidade de liberação de íons cálcio, resultando no aumento do pH de maneira significativa após 7 dias, podendo a alteração do pH influenciar na ação antibacteriana do material (FORMOSA et al., 2013).

O Biodentine (Septodont Ltd., Saint Maur des Fausse's, França) é um novo cimento reparador inorgânico que contém silicato tricálcio (Ca_3SiO_5), anunciado como "substituto bioativo da dentina". O material é indicado como alternativa aos outros cimentos que possuem silicato de cálcio, tais como MTA e Bioaggregate, pois o Biodentine apresenta melhores propriedades físicas e biológicas e apresenta as mesmas indicações clínicas do MTA (RAJASEKHARAN et al., 2014). O Biodentine é composto por uma porção sólida, que consiste em um pó contendo silicato tricálcico ($3\text{CaO}.\text{SiO}_2$), carbonato de cálcio (CaCO_3) e óxido de zircônio (ZrO_2) e uma porção líquida contendo cloreto de cálcio ($\text{CaCl}_2.2\text{H}_2\text{O}$) (CAMILLERI et al., 2012). O material

possui um tempo de manipulação de 6 minutos, com presa inicial em até 12 minutos e presa final em 45 minutos (MALKONDU et al., 2014). Além disso, por sua vez, o Biodentine possui um pH alcalino de valor 10 após 3 horas, não havendo diminuição significativa do valor do pH no período de até 24 horas (CECI et al., 2015).

Na literatura, podemos encontrar alguns estudos comparando a atividade antimicrobiana de alguns cimentos de uso endodôntico, incluindo os cimentos que contém silicato de cálcio. Porém, em relação ao Neo MTA Plus e ao Biodentine esta propriedade foi pouco explorada.

Estudo de Poggio et al. (2014) avaliaram a atividade antibacteriana de diversos cimentos de uso endodôntico, contendo hidróxido de cálcio ou silicato de cálcio (MTA Angelus e o Biodentine) frente a *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius* e *Streptococcus sanguis*, pelo método de difusão em ágar. Os autores concluíram que os cimentos contendo silicato de cálcio apresentaram ação antimicrobiana, contudo os cimentos a base de hidróxido de cálcio apresentaram, em geral, maiores halos de inibição de atividade antibacteriana.

Bhavana et al. (2015), por sua vez, avaliaram a atividade antimicrobiana do Biodentine, comparado ao ProRoot MTA e ao cimento de ionômero de vidro frente a *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis* e *Escherichia coli* e *Candida albicans* isolados. A formação de halos de inibição quando os materiais estavam em contato direto com os microrganismos foi observada. Os autores verificaram que todos os materiais apresentaram ação antimicrobiana, sendo que o Biodentine apresentou maiores halos de inibição do que o MTA e o cimento de ionômero de vidro.

Por outro lado, Ceci et al. (2015) avaliaram, entre outros fatores, a ação antimicrobiana do MTA Angelus, ProRoot MTA, *Intermediate Restorative Material* (IRM) e Biodentine em relação a alguns microrganismos específicos e isolados. Os resultados mostraram maiores halos de inibição de *Streptococcus mutans* quando utilizados o MTA Angelus, ProRoot MTA e IRM. Enquanto o Biodentine apresentou maior halo de inibição quando testado com *Streptococcus sanguis*.

Recentemente, Hiremath et al. (2015) avaliaram em um estudo *in vitro* a concentração mínima inibitória, pelo método de diluição, do MTA Plus e Biodentine em comparação com o ProRoot MTA. Os microrganismos utilizados foram o *Enterococcus faecalis* e a *Candida albicans*. A partir dos resultados obtidos, foi possível concluir que o Biodentine e o ProRoot MTA apresentaram propriedades

antifúngicas e antibacterianas. Contudo, o MTA Plus, apesar de apresentar boas propriedades antifúngicas, não foi eficiente contra *Enterococcus faecalis*.

Cabe salientar que os referidos estudos (POGGIO et al., 2014; BHAVANA et al., 2015; CECI et al., 2015; HIREMATH et al., 2015) avaliaram a atividade antimicrobiana dos diversos cimentos através de testes de difusão em discos de ágar – comparando halos de inibição – ou do método de diluição em meio de cultura líquido, após inoculação de microrganismos específicos, principalmente o *Enterococcus faecalis*. Contudo, tais teste “in vitro” apresentam limitações como a possibilidade de difusão do material pelo ágar, não representando a sua real ação antimicrobiana. Além disso, as metodologias apresentadas não levam em consideração a organização dos microrganismos orais na forma de biofilme, devido a utilização exclusiva de cepas laboratoriais. Assim, trabalhos envolvendo modelos de biofilme multi-espécies formados a partir de microrganismos presentes na cavidade oral podem ser importantes para o estabelecimento da correta ação antimicrobiana de materiais de uso endodôntico.

Metodologias semelhantes as descritas anteriormente (POGGIO et al., 2014; BHAVANA et al., 2015; CECI et al., 2015; HIREMATH et al., 2015) foram aplicadas utilizando bactérias aeróbias e anaeróbias com a finalidade de demonstrar a capacidade antimicrobiana de soluções irrigadoras, tais como clorexidina (PORTENIER et al., 2002) e hipoclorito sódio (VIANNA et al., 2004), além do MTAD (TORABINEJAD et al., 2003). Entretanto, o crescimento dos microrganismos nos canais radiculares ocorre na forma de biofilme, portanto os estudos anteriores não refletem a real efetividade dos materiais analisados (PAPPEN et al., 2010). Desta forma, biofilmes polimicrobianos formados em blocos de dentina geram uma representação mais realista da capacidade antimicrobiana de diferentes materiais (STOJICIC et al., 2012). Porém, atualmente, os estudos que utilizam biofilme têm avaliado soluções irrigadoras ou medicações antibióticas (PAPPEN et al., 2010; ORDINOLA-ZAPATA et al., 2012; BÖTTCHER et al., 2015), não tendo sido encontradas pesquisas utilizando esta metodologia para avaliar a atividade antimicrobiana de cimentos de uso endodôntico.

De acordo com Shen et al. (2011), biofilmes maduros, com mais de 3 semanas de crescimento, podem apresentar maior resistência a agentes antimicrobianos. Isso ocorre porque os biofilmes maduros possuem mais matriz

extra-celular em sua composição, aumentando as comunicações intercelulares e possibilitando trocas gênicas e a ocorrência de mutações. Assim, a idade e o estágio nutricional de biofilmes devem ser controlados, para que possam ser utilizados em experimentos científicos que avaliam ação antimicrobiana de diferentes materiais.

Outro ponto importante é o método de análise do biofilme sobre a superfície de dentina. A avaliação direta com microscopia confocal de varredura a laser é indicada, pois proporciona dados sólidos da quantificação microbiana, quando comparado ao método de contagem de cultura (SHEN et al., 2010). Assim, pelo método de análise de microscopia confocal a laser é possível avaliar tridimensionalmente a viabilidade do biofilme microbiano aderido a parede de dentina, mesmo após a utilização de agentes antimicrobianos (ORDINOLA-ZAPATA et al., 2012).

Portanto, visando o controle da ocorrência de infecções ou reinfecções endodônticas, estudos que utilizam biofilmes multi-espécies, formados a partir de uma amostra clínica (biofilme microcosmo), são relevantes para a compreensão da atividade antimicrobiana dos diferentes materiais. Além disso, modelos de estudo com biofilme microcosmo apresentam uma maior aproximação à condição clínica comparados aos modelos “in vitro” que utilizam cepas laboratoriais para a formação de biofilme. Assim, estudos mais aprofundados sobre o efeito de cimentos de uso endodôntico, que contêm silicato de cálcio, em biofilme multi-espécies microcosmo são de grande importância.

3 ARTIGO CIENTÍFICO

Title

Antimicrobial effect of calcium silicate-based endodontic cements against microcosm formed multispecies biofilms: a confocal microscopy study.

Abstract

Intoduction: This study aimed to assess antimicrobial effect of Neo MTA Plus, Biodentine and MTA Angelus after contact with dentine infected by microcosm formed multispecies biofilm, using confocal laser scanning microscopy (CLSM), and to describe the microrganisms morphology, by SEM. **Methods:** Fifty-six dentin blocks (height=4 x width=5 x length=4 mm) were made from human teeth roots, cleaned and sterelized. Two blocks were used to sterelization control. The others 54 blocks were fixed in Hawley retainers made for 6 volunteers that used it for 72h. After this period, they were placed in wells with BHI for 21 days, at 37°C. At the end of the biofilm growth, the samples were randomly divided in 5 groups: Neo MTA Plus (n=12), Biodentine (n=12), MTA Angelus (n=12), negative control (n=12), and SEM analysis (n=6). The cements were placed in contact with the blocks of the tested groups. All samples were replaced in wells with BHI by 7 days at 37°C. CLSM analysis evaluated the dentin blocks and cements isolated. SEM observation were performed in the six samples of the respective group. **Results:** All groups presented a level of viable bacteria higher than 50%. Neo MTA Plus was the only one that showed significant difference from the negative control group (P=.0379). SEM analysis showed a biofilm composed of spherical and rod-shaped bacteria surrounded by extracellular matrix. **Conclusions:** All groups presented viable bacteria and Neo MTA Plus had the best antimicrobial effect.

Key Words: Antimicrobial agents; Biodentine; Biofilm; Confocal microscopy; Mineral trioxide aggregate; Neo MTA Plus; Tricalcium silicate.

Introduction

Teeth with furcal perforations or requiring surgical treatment are indicated for the use of calcium silicate-based materials (1). In these situations, there may be the presence of microorganisms organized or not in the form of biofilm (1, 2). Microorganisms organized in biofilm favors the maintenance of viable bacteria (2, 3). The endodontic biofilm is characterized as a set of microorganisms and extra-cellular matrix adhered to dentin walls. It consists of multilayered and multispecies of strict and facultative anaerobic bacteria and fungi (2, 4-9). This biofilm shows a higher resistance against antimicrobials and is commonly found in teeth with apical periodontitis (2, 3, 10).

MTA is the most widely investigated and used for these clinical situations. It presents excellent physical and biological properties, among which the sealing ability and the bioactivity stand out (11, 12). Due to physicochemical properties limitations (11), other calcium silicate-based cements, as Neo MTA Plus (Avalon Biomed, Bradenton, FL, USA), Biodentine (Septodont, Saint Maur des Fossés, France) and MTA Angelus (Angelus, Londrina, PR, Brazil), have been introduced in the market.

Neo MTA Plus is a bioceramic cement little studied so far. This material is presented as a powder and an anti-washout gel and is similar to MTA Plus (Avalon Biomed Inc., Bradenton, FL, USA). Both are composed by calcium, silicon, and oxygen. Besides that, they present sodium, magnesium and sulfur traces, and are based on Portland cement. However, bismuth oxide in MTA Plus was replaced by tantalum oxide in Neo MTA Plus (13).

Biodentine has been announced as the "bioactive dentin substitute". It consists of a powder containing tricalcium silicate, calcium carbonate and zirconium oxide and a liquid portion containing calcium chloride (14). This material is an alternative to MTA-like materials because it has shown better physical and biological properties (15).

There are a considerable number of *in vitro* studies about the properties of calcium silicate-based materials. However, there is a lack of knowledge about the antimicrobial action of these materials on multispecies biofilm formed from clinical samples (microcosm biofilm). Thus, the present study aimed to assess antimicrobial effect of Neo MTA Plus, Biodentine and MTA Angelus in contact with dentin infected by microcosm formed multispecies biofilm using confocal laser scanning microscopy

(CLSM), and to describe the morphology of the microorganisms found in the biofilm samples, by scanning electron microscopy (SEM) analysis.

Materials and methods

The present study was approved by the Research and Ethics Committee of the Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil (CAAE: 51315215.7.0000.5342).

Root cervical portions of human teeth were used to make fifty-six dentin blocks (height=4 x width=5 x length=4 mm) with a central groove (1mm wide and 3mm deep) to facilitate the formation and nutrition of the biofilm during the methodological execution (Figure 1). The teeth were cut using a double-face diamond disc (Extec, Enfield, CT, USA) under refrigeration in the precision cutting machine Isomet 2000 (Buehler, Lake Bluff, IL, USA). Each block was cleaned by immersion in 1% sodium hypochlorite (Biodinâmica Química e Farmacêutica, Ibiporã, PR, Brazil), for 15 minutes (with exchange of solution every 5 minutes), followed by 17% EDTA (Biodinâmica Química e Farmacêutica, Ibiporã, PR, Brazil), for 5 minutes. Then, sterilization at 121°C and 1 atm for 15 minutes was performed. Two blocks of dentin were placed in brain-heart infusion (BHI) (KASVI, Curitiba, PR, Brazil) and maintained for 24 hours at 37°C to control the sterilization process.

To the biofilm infection the fifty-four dentin blocks were fixed on Hawley retainers made for 6 volunteers (3 male and 3 female) with similar eating habits and oral hygiene habits. All volunteers were non-smokers, had no systemic disease and do not received antibiotic therapy in the last 3 months before the study or during it. The volunteers used the devices for a period of 72 hours (16), removing them only during feeding and oral hygiene. The devices were kept in contact with a damp cotton gauze when removed from the oral cavities. Each volunteer produced 9 blocks of infected dentin. After, the specimens were immersed in 5 mL of BHI (KASVI, Curitiba, PR, Brazil) inside 24-well cell culture plates (TPP, Trasadingen, SH, Switzerland) identified according to the volunteer, and maintained at 37°C under aerobic conditions for 21 days. Three milliliters of BHI was replaced every 24 hours. After this period, the specimens were removed from the culture wells, irrigated with 1 mL of distilled water and distributed, by stratified randomization, among the

experimental groups: Neo MTA Plus (n=12), Biodentine (n=12), MTA Angelus, Negative control (n=12) and SEM (n=6). Each test and control group randomly received 2 samples from each volunteer. The SEM group received one sample from each volunteer.

Samples from the Neo MTA Plus, Biodentine and MTA Angelus groups were placed in contact with the respective test material. All cements were handling in accordance with the manufacturers instructions, inserted in a circular plastic mold (5 x 2mm) and positioned on each dentin block after the initial setting time of the material, according to the manufacturers. The negative control group was kept without any cement. The sets were restocked inside 24-well cell culture plates filled with 3 mL of BHI immersing the sample to the level of the dentin/cement interface, and maintained under aerobic conditions at 37°C for 7 days. Every 24 hours, 1 mL of BHI was removed and replaced by 1 mL of fresh BHI. All sample handling was performed under laminar flow.

Confocal laser scanning analysis

Each dentin block of the negative control group and each dentin block and cement of the experimental groups, that were separated for analysis, were examined by confocal laser scanning microscopy (CLSM) (Olympus, Tokyo, Japan). The Live/Dead BacLight Bacterial Viability kit L-13152 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) was used for determination of bacterial viability (17, 18). The SYTO 9 probe and the propidium iodide probe have the ability to label all bacteria in population and only in bacteria with damage plasmatic membrane, respectively. The live bacteria present in the biofilm are stained in green and the dead in red. The dye was prepared by the dissolution of one bubble of each dye powder in a total of 10 mL of distilled water. Each sample of dentin and cement received 10 µL of dye solution and it was maintained on the samples for a total period of 5 minutes before the microscope analysis. Four confocal "stacks" of the dentin that were in contact with the cements samples (two in each side of the central groove) and two of each cement sample were captured using a 60X magnification oil lens with 1 µm step size and format of 512 x 512 pixels. A total of 264 confocal "stacks" were obtained.

The viability evaluation was performed using the bio Image_L software (The MathWorks, Natick, MA, USA) (19). This software is able to quantify information about the green and red bacteria subpopulations using the biofilm analyses tool. It is represented as a percentage (%) of the biofilm biovolume. The noise reduction factor was established to 0.1 to minimize the colored background.

SEM analysis

The six samples of this group were metalized (gold) and submitted to SEM (Philips XL 30, Philips, Amsterdam, Netherlands) analysis. Two images were randomly obtained from each sample, with magnification 5000X and 25 kV.

Statistical analysis

Confocal data was analyzed using GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) considering viable bacteria. Normal distribution was confirmed by Kolgomorov-Smirnov test. Ordinary one-way ANOVA and Tukey's multiple comparisons tests was applied to compare groups. The significance was set at $P < .05$. The SEM analysis of the images was performed descriptively considering the bacterial morphology present in the biofilm.

Results

Table 1 and Figure 2 summarize antimicrobial effect results. All groups presented bacterial viability greater than 50%. Neo MTA Plus had the highest antimicrobial effect, affecting 46.97% of the biofilm and being the only tested material to present a significant difference compared to the negative control group ($P = .0379$).

The SEM images presented a standard biofilm composed of spherical and rod-shaped bacteria, compatible with coccus and bacilli. Cells were isolated or grouped into two or more units, and surrounded by extracellular matrix (Figure 3).

Discussion

This study proposed to evaluate the antimicrobial activity of three calcium silicate based cements available on the market: Neo MTA Plus, Biodentine and MTA Angelus. The results of the CLSM analysis showed a high level of viable bacterial biofilm even after 7 days of contact of the cement with the infected dentin block. The organization of the microorganisms in the form of multispecies biofilm, therefore, hinder the antimicrobial action of these materials (2, 4). The comparison between the three materials tested did not present statistical differences. However, Neo MTA Plus was the only cement to present a significant difference compared to the negative control group.

The difference found in the Neo MTA Plus group may be related to the composition of the material and its physicochemical properties. Although few studies about physicochemical properties of this material have been published (13), the similar composition to MTA Plus may allow comparisons in this regard. MTA Plus mixed with the anti-washout gel has a prolonged ability to release calcium ions and increase local pH compared to other MTA-like materials (20). This may relate to a higher solubility of the material in aqueous medium and the formation of a layer of calcium phosphate on its surface (20). Moreover, considering the possible higher solubility of these materials (20), the volume of BHI in the cell culture wells, containing the sets of the dentine block and cement, had to be limited to 3 mL to avoid the contact of the medium with the cement that could have impaired the results of antimicrobial activity.

It is common to use isolated bacterial species or single-species biofilm, and the use of *Enterococcus faecalis* is frequent (21-24). Nevertheless, biofilms formed using dentine as substrate generate a more realistic representation (25). Endodontic infections are composed of several strict and facultative anaerobic microorganisms (5). The facultative anaerobic microorganisms are related to cases of secondary or persistent infection and include bacteria such as *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* (6-9). In addition, *Candida albicans* is often isolated from the root canal (6). The use of multispecies microcosm biofilm reproduced a clinical situation of secondary infection, which shows resistance to antimicrobial agents (6-9). This fact may have contributed to the presence of viable micorganism in all materials tested.

The decision to use microcosm formed multispecies biofilm was taken in search of greater proximity to the actual organization and heterogeneity of the bacterial biofilm. Thus, the characterization of the microorganisms presented in the current study was necessary aiming to associate the biofilm sample with endodontic microbiota. SEM analysis allowed to identify a pattern of the biofilm cellular morphology, independent of the volunteers. The microorganisms present in the biofilm can be identified as coccus and bacilli. Teeth with pulp necrosis and presence of abscess present these types of bacteria (26). Among the Gram- and Gram+ bacilli, the following stand out: *Prevotella buccae*, *intermedia* and *oralis*, *Fusobacterium necrophorum*, *Porphyromonas endodontalis*, *Bacteroides ureolyticus*, *Capnocytophaga* spp., and *Clostridium* spp.. Gram- and Gram + coccus were also found, such as: *Gemella morbilourum*, *Parvimonas micron* and *Propionibacterium acnes* (26).

In addition, the biofilm maturation stage also influences the antimicrobial effectiveness of endodontic materials. A biofilm is considered mature when there is growth for a period longer than 21 days, presenting greater resistance to antimicrobial agents (27). Therefore, the age and nutritional status of biofilms used in scientific experiments involving antimicrobials should be controlled as performed herein.

The contact time of the cements with the biofilm was determined according to the physicochemical characteristics of the materials tested, especially pH. All materials tested have alkaline pH. MTA Plus shows a significant increase in pH up to 7 days (28). Biodentine has a pH equal to 10 in the 3 hours period, and there is no decrease of this value even after 24h (23). MTA, in turn, has a pH equal to 10 up to 3 days, when there is stabilization by a value of 12 (11). Thus, considering the differences in pH stabilization of the tested materials, the 7-day period was considered appropriate.

Data available in the literature about antimicrobial effect of calcium silicate-based cements may be poorly compared to the present results. Previous studies also evaluated the antimicrobial effect of various cements (21-24). MTA Angelus and Biodentine are described as materials that exhibit antimicrobial action, yet are less efficient than cements based on calcium hydroxide (21). In addition, Biodentine presented a greater antimicrobial action than MTA (22), presenting good antifungal

and antibacterial properties (24). MTA Plus, on the other hand, was not effective against *Enterococcus faecalis* despite good antifungal properties (24). However, the mentioned investigations analyzed isolated species of microorganisms by agar disc diffusion tests or tube dilution method. Moreover, the CLSM analysis provides a solid data of microbial quantification and allows the three-dimensional evaluation of the viability of the biofilm adhered to dentin, even after the use of antimicrobial agents (17, 18, 29). It is not possible when agar disc and dilution methods are employed.

It is important to emphasize that, considering the growth of microorganisms in the form of biofilm in clinical situations, studies using the mentioned methodologies do not reflect the real effectiveness of the materials tested (30). Although the literature reports a better antimicrobial effect of calcium silicate-based materials than the observed in the present study, the results obtained contributed with information about the antimicrobial activity of Neo MTA Plus, Biodentine and MTA Angelus. The method used provides an approximation of clinical reality by the direct contact of the material with multispecies biofilm, as frequently occur in cases of furcal perforation and retrofilling procedures. Despite of this, previous investigations showed that the high sealing ability of calcium silicate-based materials may contribute to an additional antimicrobial effect of these cements (31-33), related to the limited nutrient sources of the biofilm (34). In addition, cavity disinfection procedures may be conducted prior to filling with calcium silicate-based materials.

Based on the results and methods used can be concluded that all cements showed viable bacterial after 7 days in contact with microcosm formed multispecies biofilm and that Neo MTA Plus presented a better antimicrobial effect compared to the control. The bacterial morphology observed in the biofilm samples are compatible with those present in endodontic infections.

Acknowledgments

The authors deny any conflict of interest. The authors would like to thank the Microscopy and Microanalyses Center (CMM), UFRGS, for CLSM and SEM analysis, and the Laboratory of Oral Biochemistry and Microbiology (LABIM), UFRGS.

References

1. Sinai IH. Endodontic perforations: their prognosis and treatment. *J Am Dent Assoc* 1977;95(1):90-5.
2. Siqueira-Júnior JF, Rôças IN, Lopes HP. Patterns of microbial colonization in primary root canal infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002;93:174-8.
3. Faria-Júnior NB, Tanomaru-Filho M, Berbert FL, Guerreiro-Tanomaru JM. Antibiofilm activity, pH and solubility of endodontic sealers. *Int Endod J* 2013;46(8):755-62.
4. Nair PNR. Light and electron microscopic studies of root canal flora and periapical lesions. *J Endod* 1987;13:29-39.
5. Siqueira-Júnior JF. Endodontic infections: concepts, paradigms, and perspectives. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002;94(3):281-93.
6. Morse DR. Endodontic microbiology in the 1970s. *Int. Endod J* 1981;14:69-79.
7. Seltzer S, Faber PA. Microbiologic factors in endodontology. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1994;78(5):634-45.
8. Siqueira-Júnior JF, Rôças IN, Souto R, Uzeda M, Colombo AP. Checkerboard DNA-DNA hybridization analysis of endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2000;89:744-8.
9. Siqueira-Júnior JF. Strategies to treat infected root canals. *J Calif Dent Assoc* 2001;29:825-37.
10. Ricucci D, Siqueira-Júnior JF. Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. *J Endod* 2010;36(8):1277-88.
11. Torabinejad M, Hong CU, McDonald F, Pittford TR. Physical and chemical properties of a new root-end filling material. *J Endod* 1995;21(7):349-53.
12. Scarparo RK, Haddad D, Acasigua GA, Fossati AC, Fachin EV, Grecca FS. Mineral trioxide aggregate-based sealer: analysis of tissue reactions to a new endodontic material. *J Endod* 2010;36(7):1174-8.
13. Camilleri J. Staining potential of Neo MTA Plus, MTA Plus and Biodentine used for pulpotomy procedures. *J Endod* 2015;41(7):1139-45.

14. Camilleri J, Kraij P, Veber M, Sinagra E. Characterization and analyses of acid-extractable and leached trace elements in dental cements. *Int Endod J* 2012;45(8):737-43.
15. Rajasekharan S, Martens LC, Cauwels RG, Verbeeck RM. Biodentine material characteristics and clinical applications: a review of the literature. *Eur Arch Paediatr Dent* 2014;15(3):147-58.
16. Ordinola-Zapata R, Bramante CM, Minotti PG, Cavenago BC, Garcia RB, Bernardineli N, Jaramillo DE, Duarte MAH. Antimicrobial activity of triantibiotic paste, 2% Chlorhexidine Gel, and Calcium Hydroxide on an Intraoral-infected Dentin Biofilm Model. *J Endod* 2013; 36(1):115-8.
17. Ordinola-Zapata R, Bramante CM, Cavenago B, Graeff MSZ, Gomes De Moraes I, Marciano M, Duarte MAH. Antimicrobial effect of endodontic solutions used as final irrigants on a dentine biofilm model. *Int Endod J* 2012;45:162-8.
18. Böttcher DE, Sehnen NT, Montagner F, Parolo CCF, Grecca FS. Evaluation of the effect of *Enterococcus faecalis* biofilm on the 2% chlorhexidine substantivity: an *in vitro* study. *J Endod* 2015;21(8):1364-70.
19. Chávez de Paz LE. Image analysis software based on color segmentation for characterization of viability and physiological activity of biofilms. *Appl Environ Microbiol* 2009;75(6):1734-9.
20. Gandolfi MG, Siboni F, Primus CM Pratti C. Ion release, porosity, solubility, and bioactivity of MTA Plus tricalcium silicate. *J Endod* 2014;40(10):1632-7.
21. Poggio C, Arciola CR, Beltrami R, Monaco A, Dagna A, Lombardini M, Visai L. Cytocompatibility and antibacterial properties of capping materials. *ScientificWorldJournal* 2014;2014:181945.
22. Bhavana V, Chaitanya KP, Gandhi P, Patil J, Dola B, Reddy RB. Evaluation of antibacterial and antifungal activity of new calcium-based cement (Biodentine) compared to MTA and glass ionomer cement. *J Conserv Dent* 2015;18:44-6.
23. Ceci M, Beltrami R, Chiesa M, Colombo M, Poggio C. Biological and chemical-physical properties of root-end filling materials: a comparative study. *J Conserv Dent* 2015;18(2):94-9.
24. Hiremath GS, Kulkarni RD, Naik BD. Evaluation of minimal inhibitory concentration of two new materials using tube dilution method: an *in vitro* study. *J Conserv Dent* 2015;18(2):159-62.

25. Stojcic S, Shen Y, Qian W, Johnson B, Haapasalo M. Antibacterial and smear layer removal ability of a novel irrigant, QMiX. *Int Endod J* 2012;45(4):363-71.
26. Montagner F. Comunidades microbianas em canais radiculares e abscessos periapicais agudos e suscetibilidade de algumas bactérias anaeróbias estritas isoladas [thesis]. Piracicaba (SP): University of Campinas; 2010.
27. Shen Y, Stojcic S, Haapasalo M. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine against bacteria in biofilms at different stages of development. *J Endod* 2011;37(5):657-61.
28. Formosa LM, Mallia B, Camilleri J. Mineral trioxide aggregate with anti-washout gel properties and microstructure. *Dent Mater* 2013;29(3):294-306.
29. Shen Y, Stojcic S, Haapasalo M. Bacterial viability in starved and revitalized biofilms: comparison of viability staining and direct culture. *J Endod* 2010;36(11):1820-3.
30. Pappen FG, Shen Y, Qian W, Leonardo MR, Giardino L, Haapasalo M. *In vitro* antibacterial action of Tetraclean, MTAD and five experimental irrigation solutions. *Int Endod J* 2010;43(6):528-35.
31. Hashem AAR, Hassanien EE. ProRoor MTA, MTA-Angelus and IRM used to repair large furcation perforations: sealability study. *J Endod* 2008;34:59-61.
32. Tran D, Glickman GN, Woodmansey KF. Comparative analysis of calcium silicate-based root filling materials using an open apex model. *J Endod* 2016;42(4):654-8.
33. Guneser MB, Akbulut MB, Eldeniz AU. Effect of various endodontic irrigants on the push-out bond strength of Biodentine and conventional root perforation repair materials. *J Endod* 2013;39(3):380-4.
34. Wang Z, Shen Y, Haapasalo M. Dentin extends the antibacterial effect of endodontic sealers against *Enterococcus faecalis* biofilms. *J Endod* 2014;40(4):505-8.

Figure legends

Figure 1 – Illustrative image of the dentin block used for the microcosm multispecies biofilm formation: (a) height = 4mm, (b) width = 5mm e (c) length = 4mm.

Figure 2 – CLSM images (60X) representing the mean percentual (%) of bacterial viability in the different groups: (a) Neo MTA Plus (%), (b) Biodentine (%), (c) MTA Angelus (%), (d) negative control (%). Green and red represents live and dead bacteria, respectively.

Figure 3 – SEM image (5000X) to illustrate the biofilm morphology. Images compatible with coccus (*) and bacilli (Δ).

Figure 1

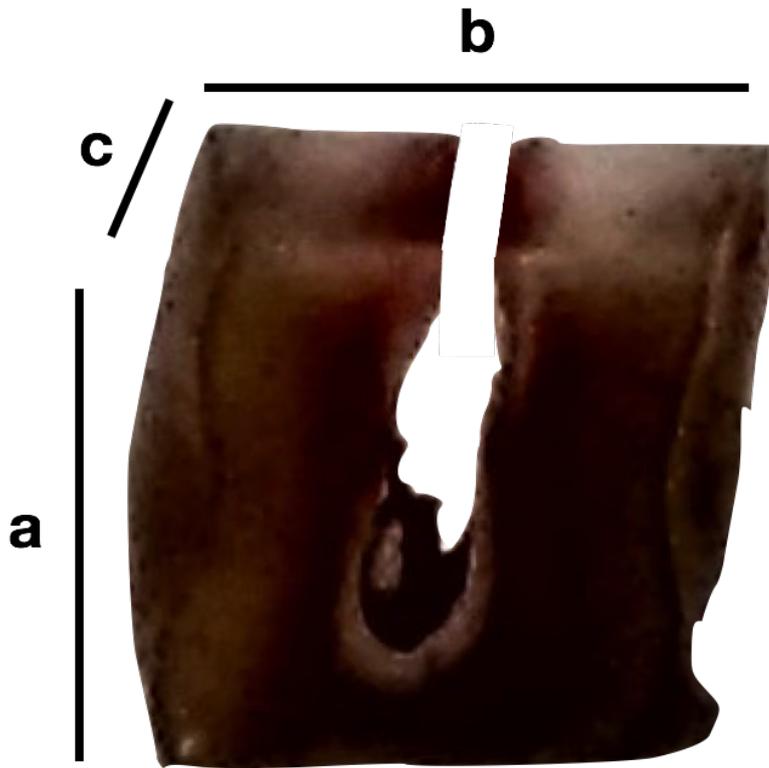


Figure 2

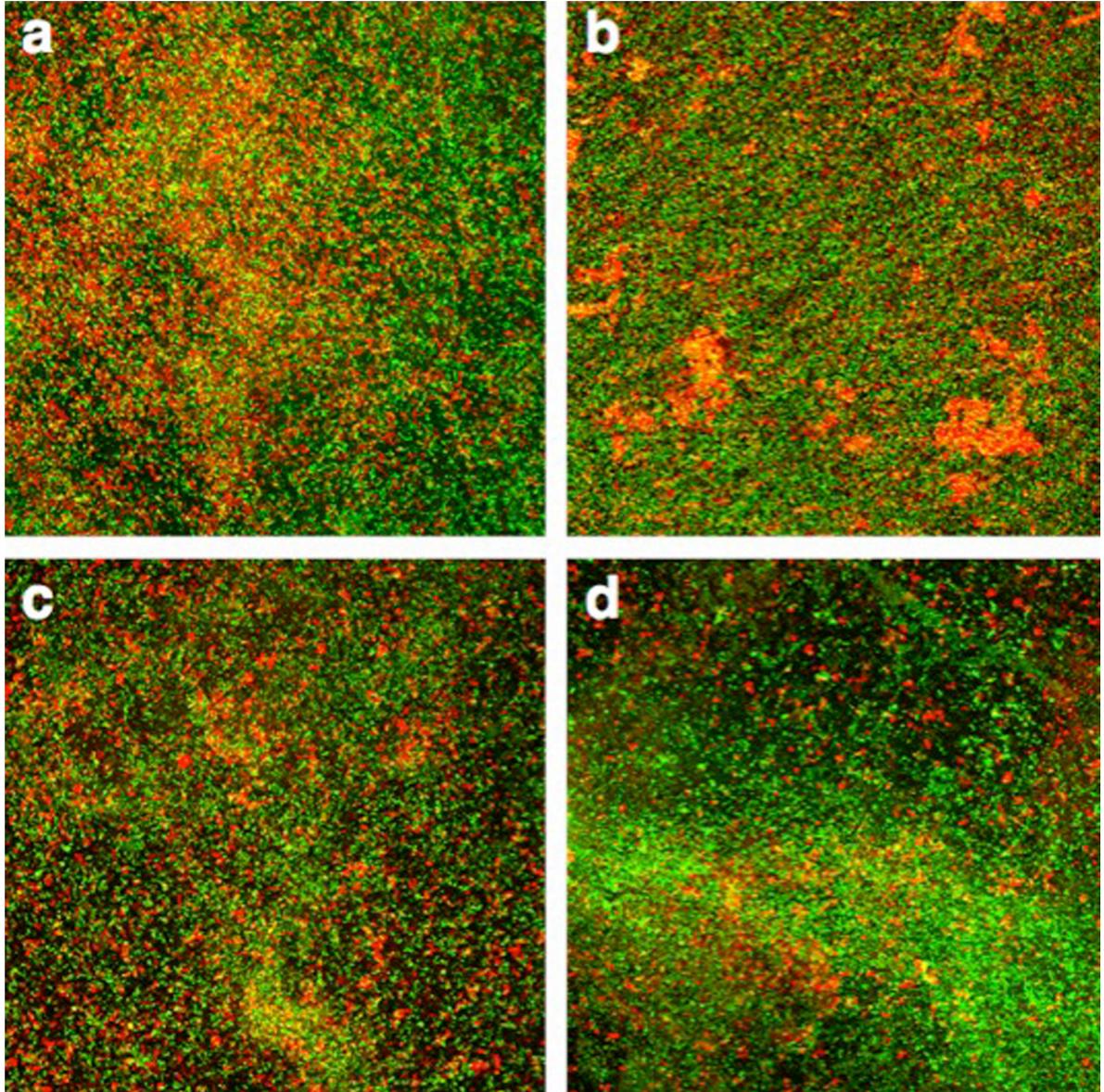


Figure 3

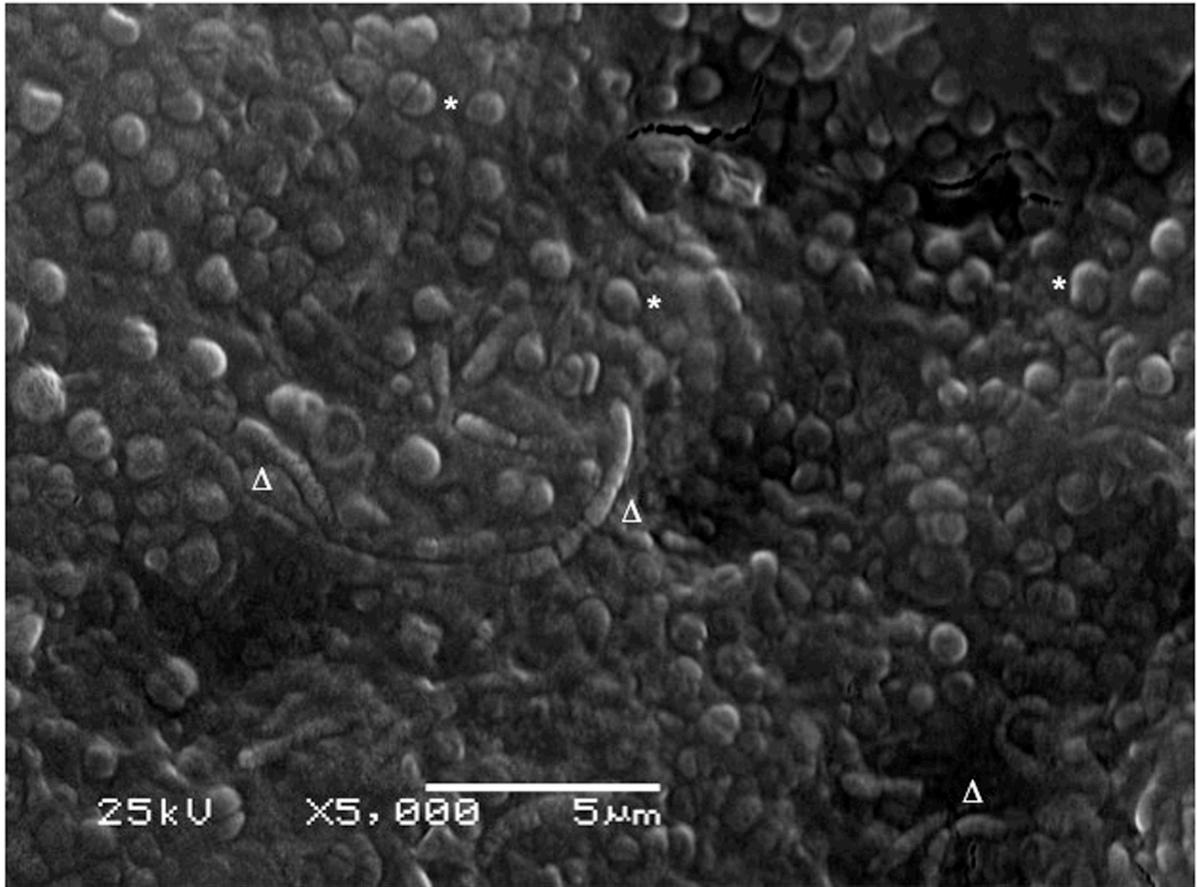


Table 1 – Mean and standart deviation of the percentage of live cells (green) after 7 days of contact between the cements and the biofilm.

Neo MTA Plus	Biodentine	MTA Angelus	Negative Control
53.03 (18.55) ^a	67.65 (19.72) ^{ab}	69.53 (12.32) ^{ab}	73.65 (20.74) ^b

* Different letters in each row indicate significant difference (P<.05)

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando os resultados deste estudo, a partir da análise por Microscopia Confocal à Laser, é possível concluir que mais de 50% das bactérias organizadas em biofilme permaneceram viáveis mesmo após 7 dias de contato com os cimentos contendo silicato de cálcio. Além disso, o Neo MTA Plus foi o único material testado que demonstrou diferença significativa comparado ao grupo controle negativo, que não recebeu nenhum tipo de tratamento antimicrobiano. Por sua vez, a análise através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das amostras de dentina infectada por biofilme oral permitiu a identificação morfológica de bactérias de forma circular e de bastonetes, isoladas ou agrupadas em duas ou mais unidades e circundadas por matriz extra-celular. Embora não tenha sido possível realizar a identificação precisa das espécies microbianas presentes nas amostras de biofilme, as morfologias bacterianas encontradas na avaliação por MEV podem ser relacionadas a presença de *coccus* e bacilos, frequentemente encontrados em dentes com necrose pulpar e abscesso periapical.

As divergências encontradas neste estudo, comparado aos que avaliaram atividade antimicrobiana de cimentos contendo silicato de cálcio já publicados na literatura, podem estar relacionadas com as diferenças metodológicas existentes. O presente estudo avaliou a ação antimicrobiana desses cimentos após contato com dentina infectada por biofilme oral formado “in situ”, enquanto os demais utilizaram somente espécies isoladas. Além disso, a análise por Microscopia Confocal à Laser é mais precisa na determinação de atividade microbiana do que metodologias utilizando halos de inibição ou contagem de unidades formadoras de colônias, pois permite a visualização tridimensional da viabilidade do biofilme.

Portanto, este estudo contribui com novas informações a respeito da ação antimicrobiana dos cimentos de uso endodôntico que contêm silicato de cálcio por aproximar os testes “in vitro” da realidade clínica. Da mesma forma, este estudo demonstra que a metodologia de uso de biofilme bacteriano e análise por Microscopia Confocal à Laser, já descrita na literatura para teste de soluções irrigadoras do canal radicular, também é válida e pode ser aplicada em estudos envolvendo cimentos de uso endodôntico.

REFERÊNCIAS

- BHAVANA, V.; CHAITANYA, K.P.; GANDI, P.; PATIL, J.; DOLA, B.; REDDY, R.B. Evaluation of antibacterial and antifungal activity of new calcium-based cement (Biodentine) compared to MTA and glass ionomer cement. **J. Conserv. Dent.**, Mumbai, v. 18, no. 1, p. 44–6, Jan.-Feb. 2015.
- BÖTTCHER, D.E.; SEHNEN, N.T.; MONTAGNER, F.; PAROLO, C.C.F.; GRECCA, F.S. Evaluation of the effect of *Enterococcus faecalis* biofilm on the 2% Chlorhexidine substantivity: an *in vitro* study. **J. Endod.**, Baltimore, v. 21, no. 8, p. 1364-70, Ago. 2015.
- CAMILLERI, J. Modification of mineral trioxide aggregate. Physical and mechanical properties. **Int. Endod. J.**, Oxford, v. 41, no. 10, p. 843-9, Out. 2008.
- CAMILLERI, J.; KRAIJ, P.; VEBER, M.; SINAGRA, E. Characterization and analyses of acid-extractable and leached trace elements in dental cements. **Int. Endod. J.**, Oxford, v. 45, no. 8, p.737-743, Ago. 2012.
- CAMILLERI, J. Staining potencial of Neo MTA Plus, MTA Plus and Biodentine used for pulpotomy procedures. **J. Endod.**, Baltimore, v.41, no. 7, p.1139-45, Jul. 2015.
- CECI, M.; BELTRAMI, R.; CHIESA, M.; COLOMBO, M.; POGGIO, C. Biological and chemical-physical properties of root-end filling materials: a comparative study. **J. Conserv. Dent.**, Mumbai, v. 18, no. 2, p. 94-99, Mar.-Apr. 2015.
- DUARTE, M.A.H.; WECKWETH, P.H.; MORAIS, I.G. Analysis of the antimicrobial action of sealers and pasted used in endodontic practice. **Ver. Odontol. Univ. São Paulo**, Bauru, v.11 no. 4, p.1-7, Out.-Dez. 1997.
- FARIA-JÚNIOR N.B., TANOMARU-FILHO M., BERBERT F.L., GUERREIRO-TANOMARU J.M. Antibiofilm activity, pH and solubility of endodontic sealers. **Int. Endod. J.**, Oxford, v. 46, no. 8, p. 755-62, Ago. 2013.
- FORMOSA, L.M.; MALLIA, B.; CAMILLERI, J. Mineral trioxide aggregate with anti-washout gelproperties and microstructure. **Dent. Mater.**, Kidlington, v. 29, no. 3, p. 294–306, Mar. 2013.
- HAMAMOTO, Y.; NAKAJIMA, T.; OZAMA, H. Histological changes in periodontal tissues of rat molars following perforation of the pulp and its floor. **Shika Kiso Igakkai Zasshi**, Tokyo, v. 31, no. 6, p. 627–37, Dez., 1989.
- HEYDER, M.; KRANZ, S.; VÖLPEL, A.; PFISTER, W.; WATTS, D.C.; JANDT, K.D.; SIGUSCH, B.W. Antibacterial effect of different root canal sealers on three bacterial species. **Dent. Mater.**, Kidlington, v. 29, no. 5, p. 542-9, Maio 2013.

HIREMATH, G.S.; KULKARNI, R.D.; NAIK, B.D. Evaluation of minimal inhibitory concentration of two new materials using tube dilution method: an *in vitro* study. **J. Conserv. Dent.**, Mumbai, v. 18, no. 2, p. 159-162, Mar.-Apr. 2015.

KOPPER, P.M.P.; ROSA, R.O.; FIGUEIREDO, J.A.P.; PEREIRA, C.C.; TARTAROTTI, E.; FILIPPINI, H.F. *In vitro* analysis of antimicrobial activity of three endodontic sealers. **Rev. Odonto. Ciênc.**, Porto Alegre, v.22, no. 56, p. 106-11, Abr.-Jun. 2007.

MALKONDU, O.; KAZANDAG, M.K.; KAZAZOGLU, E. A review on Biodentine, a contemporary dentine replacement and repair material. **BioMed Res. Int.**, Nova York, doi: 10.1155/2014/160951, p. 1-10, 2014.

MORSE, D.R. Endodontic microbiology in the 1970s. **Int. Endod J.**, Oxford, v. 14, no. 2, p. 69-79, Maio 1981.

NAIR, P.N.R. Light and electron microscopic studies of root canal flora and periapical lesions. **J. Endod.**, Baltimore, v. 13, no. 1, p. 29-39, Jan. 1987.

NAIR, P.N.; HENRY, S.; CANO, V.; VERA, J. 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.**, St. Louis, v. 99, no. 2, p. 231-52, Fev. 2005.

NAYAK, G.; HASAN, M.F. Biodentine – a novel dentinal substitute for single visit apexification. **Restor. Dent. Endod.**, Seul, v. 39, no. 2, p. 120-5, Maio 2014.

ORDINOLA-ZAPATA, R.; BRAMANTE, C.M.; CAVENAGO, B.; GRAEFF, M.S.Z.; GOMES DE MORAES, I.; MARCIANO, M.; DUARTE, M.A.H. Antimicrobial effect of endodontic solutions used as final irrigants on a dentine biofilm model. **Int. Endod. J.**, Oxford, v. 45, no. 2, p. 162-8, Fev. 2012.

PAPPEN, F.G.; SHEN, Y.; QIAN, W.; LEONARDO, M.R.; GIARDINO, L.; HAAPASALO, M. *In vitro* antibacterial action of Tetraclean, MTAD and five experimental irrigation solutions. **Int. Endod. J.**, Oxford, v.43, no.6, p. 528-35, Jun. 2010.

PARIROKH, M.; TORABINEJAD, M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review – part I: chemical, physical, and antibacterial properties. **J. Endod.**, Baltimore, v. 36, no. 1, p. 16–27, Jan. 2010.

POGGIO, C.; ARCIOLA, C.R.; BELTRAMI, R.; MONACO, A.; DAGNA, A.; LOMBARDINI, M.; VISAI, L. Cytocompatibility and antibacterial properties of capping materials. **ScientificWorldJournal**, Nova York, doi: 10.1155/2014/181945 p. 1-10, 2014.

PORTENIER, I.; HAAPASALO, N.; ORSTAVIK, D., YAMAUCHI, M.; HAAPASALO, M. Inactivation of the antibacterial activity of iodine potassium iodide and chlorhexidine digluconate against *Enterococcus faecalis* by dentin, dentin matrix, type-I collagen and heat-killed microbial whole cells. **J. Endod.**, Baltimore, v. 28, no. 9, p. 634-7, Set. 2002.

RAJASEKHARAN, S.; MARTENS, L.C.; CAUWELS, R.G.; VERBEECK, R.M. Biodentine material characteristics and clinical applications: a review of the literature. **Eur. Arch. Paediatr. Dent.**, Londres, v. 15, no. 3, p. 147-58, Jun. 2014.

RICUCCI, D.; SIQUEIRA JUNIOR, J.F. Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. **J. Endod.**, Baltimore, v. 36, no. 8, p. 1277-88, Ago. 2010.

RODRIGUES, R.C.V.; SOARES, R.G.; SILVA, T.M.; MAROTTA, P.S.; KILL, K.B.; DUALIBE, S.A.C.; FALCÃO, T.V.; ALVES, F.R.F. Atividade antimicrobiana de diferentes cimentos endodônticos. **Revista Brasileira de Pesquisa em Saúde**, v. 14, no. 3, p. 34-7, 2012.

SCARPARO, R.K.; HADDAD, D.; ACASIGUA, G.A.; FOSSATI, A. C.; FACHIN, E.V.; GRECCA, F.S. Mineral trioxide aggregate-based sealer: analysis of tissue reactions to a new endodontic material. **J. Endod.**, Baltimore, v. 36, no. 7, p. 1174-8, Jul. 2010.

SELTZER, S.; SINAI, I.; AUGUST D. Periodontal effects of root perforations before and during endodontic procedures. **J. Dent. Res.**, Chicago, v. 49, no. 2, p. 332-9, Mar.-Abr. 1970.

SELTZER, S.; FABER, P.A. Microbiologic factors in endodontology. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.**, St. Louis, v. 78, no. 5, p. 634-45, Nov. 1994.

SHEN, Y.; STOJICIC, S.; HAAPASALO, M. Bacterial viability in starved and revitalized biofilms: comparison of viability staining and direct culture. **J. Endod.**, Baltimore, v. 36, no. 11, p.1820-3, Nov. 2010.

SHEN, Y.; STOJICIC, S.; HAAPASALO, M. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine against bacteria in biofilms at different stages of development. **J. Endod.**, Baltimore, v. 37, no. 5, p. 657-661, Maio 2011.

SINAI, I.H. Endodontic perforations: their prognosis and treatment. **Journal of American Dental Association**, v. 95, p. 90-95, 1977.

SIQUEIRA JÚNIOR, J.F.; RÔÇAS, I.N.; SOUTO, R.; UZEDA, M.; COLOMBO, A.P. Checkerboard DNA-DNA hybridization analysis of endodontic infections. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.**, St. Louis, v. 89, no. 6, p. 744-8, Jun. 2000.

SIQUEIRA JÚNIOR, J.F. Strategies to treat infected root canals. **J. Calif. Dent. Assoc.**, Sacramento, v.29, no. 12, p. 825-37, Dez. 2001.

SIQUEIRA JÚNIOR, J.F.; RÔÇAS, I.N.; SOUTO, R.; UZEDA, M.; COLOMBO, A.P. Microbiological evaluations of acute periradicular abscesses by DNA-DNA hybridization. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.**, St. Louis, v. 92, no. 4, p. 451-457, Out. 2001.

SIQUEIRA JÚNIOR, J.F.; RÔÇAS, I.N.; LOPES H.P. Patterns of microbial colonization in primary root canal infections. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.**, St. Louis, v. 93, no. 2, p. 174-8, Fev. 2002.

SIQUEIRA JÚNIOR, J.F. Endodontis infections: concepts, paradigms, and perspectives. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.**, St. Louis, v. 94, no. 3, p. 281-93, Set. 2002.

STOJICIC, S.; SHEN, Y.; QIAN, W.; JOHNSON, B.; HAAPASALO, M. Antibacterial and smear layer removal ability of a novel irrigant, QMiX. **Int. Endod. J.**, Oxford, v. 45, no. 4, p. 363-71, Abr. 2012.

TORABINEJAD, M.; HONG, C.U.; MCDONALD, F.; PITTFORD, T.R. Physical and chemical properties of a new root-end filling material. **J. Endod.**, Baltimore, v. 21, no. 7, p. 349-353, Jul. 1995.

TORABINEJAD, M.; SHABAHANG, S.; APRECIO, R. M.; KETTERING, J. D. The antimicrobial effect of MTAD: an *in vitro* investigation. **J. Endod.**, Baltimore, v. 29, no. 6, p. 400-403, Nov. 2003.

TORABINEJAD, M.; PARIROKH, M. Mineral Trioxide Aggregate: a comprehensive literature review – part II: leakage and biocompatibility investigations. **J. Endod.**, Baltimore, v. 36, no. 2, p. 190-202, Feb. 2010.

VIANNA, M.E.; GOMES, B.P.; BERBER, V.B.; ZAIA, A.A.; FERRAZ, C.C.; DE SOUZA-FILHO, F.J. *In vitro* evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, St. Louis, v. 97, no. 1, p. 79-84, Jan. 2004.

WADA, M.; TAKASE, T.; NAKANUMA, K.; ARISUE, K.; NAGAHAMA, F.; YAMAZAKI, M. Clinical study of refractory apical periodontitis treated by apicectomy. Part 1. Root canal morphology of resected apex. **Int. Endod. J.**, Oxford, v. 31, no. 1, p. 53-6, Jan. 1998.

WANG, Z.; SHEN, Y.; HAAPASALO, M. Dentin extends the antibacterial effect of endodontic sealers against *Enterococcus faecalis* biofilms. **J. Endod.**, Baltimore, v. 40, no. 4, p. 505-8, Abr. 2014.

ANEXO A – PARECER DA COMPEAQ



Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Odontologia

PARECER CONSUBSTÂNCIADO DA COMISSÃO DE PESQUISA

Parecer aprovado em reunião do dia 06 de novembro de 2015

ATA nº 13/2015.

A Comissão de Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul após análise aprovou o projeto abaixo citado com o seguinte parecer:

Prezado Pesquisador PATRICIA MARIA POLI KOPPER MORA

Informamos que o adendo ao projeto de pesquisa ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE CIMENTOS QUE CONTÉM SILICATO DE CÁLCIO EM DENTINA INFECTADA POR BIOFILME ORAL FORMADO "IN SITU" para análise está aprovado com o seguinte parecer:

Avaliar o efeito da atividade antimicrobiana de cimentos que contêm silicato de cálcio sobre dentina infectada por biofilme formado "in situ". Metodologia: Cinquenta blocos de dentina bovina com um sulco central serão confeccionados, incluídos em Placas de Hawley e mantidos na cavidade oral de 10 voluntários durante 72 horas para indução da formação de biofilme. Após esse período, os blocos serão incubados por 21 dias em BHI caldo, permitindo a maturação do biofilme. As amostras serão divididas em 5 grupos experimentais (n=10): MTAG – MTA Angelus; NEOG – Neo MTA Plus; BIOG – Biodentine; CG – sem cimento; DNAG – hibridização DNA-DNA. No grupo DNAG, as amostras serão analisadas a fim de identificar os microrganismos presentes no biofilme oral formado "in situ", utilizando a técnica de hibridização DNA-DNA. No CG, após o período experimental (7 dias), o biofilme em contato com a superfície dentária será corado com soluções de Syto 9 e Iodeto de Propídio e analisado em microscópio confocal de varredura a laser (CLSM) para avaliar a estrutura microbiana. Nos demais grupos, o cimento em questão será colocado em contato direto com a dentina infectada durante 7 dias e, após, as duas superfícies (bloco de dentina e cimento) serão separadas, coradas e analisadas em CLSM. A análise das imagens obtidas no CLSM será realizada utilizando o programa Bioimage L e serão considerados os parâmetros de biovolume (total e de células coradas em verde ou vermelho), altura do biofilme e cobertura do substrato pelo biofilme. Os testes estatísticos adequados serão selecionados e aplicados aos resultados obtidos. Somos pela aprovação. Os autores devem cadastrar o projeto na Plataforma Brasil para posterior submissão ao CEP.

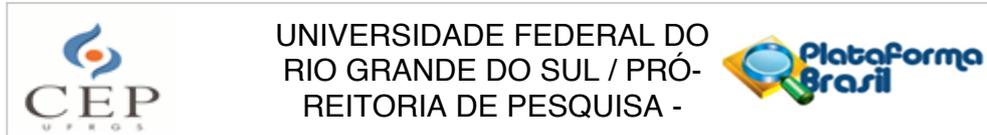
Atenciosamente,

Comissão de Pesquisa em Odontologia

Prof. Dr. Fabrício Mezzomo Collares

Coordenador da Comissão de Pesquisa ODONTOLOGIA UFRGS

ANEXO B – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Atividade antimicrobiana de cimentos que contêm silicato de cálcio em dentina infectada por biofilme oral formado "in situ"

Pesquisador: Patrícia Maria Poli Kopper Móra

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 51315215.7.0000.5347

Instituição Proponente: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.445.853

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto do Departamento de Odontologia Conservadora da Faculdade de Odontologia da UFRGS a respeito das propriedades antimicrobianas de um cimento utilizado durante a realização de tratamentos endodônticos.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Avaliar a atividade antimicrobiana de materiais que contêm silicato de cálcio em contato com dentina humana infectada por biofilme formado "in situ". Objetivo Secundário: Avaliar a viabilidade de células bacterianas presentes no biofilme oral após o contato com MTA Angelus, Neo MTA Plus e Biodentine, durante 7 dias, por meio de microscopia confocal a laser (CLSM). Analisar de forma descritiva as espécies microbianas encontradas nas amostras de biofilme oral, conforme o método de hibridização do DNA.

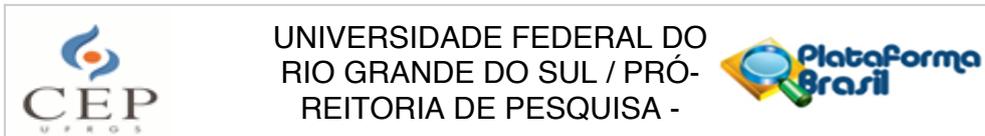
Avaliação dos Riscos e Benefícios:

As ponderações acerca de riscos e benefícios foram devidamente apresentadas.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Quarenta e cinco blocos de dentina com um sulco central serão confeccionados, incluídos em

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro
Bairro: Farroupilha **CEP:** 90.040-060
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3308-3738 **Fax:** (51)3308-4085 **E-mail:** etica@propesq.ufrgs.br



Continuação do Parecer: 1.445.853

Placas de Hawley e mantidos na cavidade oral de 9 voluntários durante 72 horas para indução da formação de biofilme. Após esse período, os blocos serão incubados por 21 dias em BHI caldo, permitindo a maturação do biofilme. As amostras serão divididas em 5 grupos experimentais (n=9): MTAG – MTA Angelus; NEOG – Neo MTA Plus; BIOG – Biodentine; CG – sem cimento; DNAG – hibridização DNA-DNA. No grupo DNAG, as amostras serão analisadas a fim de identificar os microrganismos presentes no biofilme oral formado “in situ”, utilizando a técnica de hibridização DNA-DNA. No CG, após o período experimental (7 dias), o biofilme em contato com a superfície dentária será corado com soluções de Syto 9 e Iodeto de Propídio e analisado em microscópio confocal de varredura a laser (CLSM) para avaliar a estrutura microbiana. Nos demais grupos, o cimento em questão será colocado em contato direto com a dentina infectada durante 7 dias e, após, as duas superfícies (bloco de dentina e cimento) serão separadas, coradas e analisadas em CLSM. A análise das imagens obtidas no CLSM será realizada utilizando o programa Bioimage L e serão considerados os parâmetros de biovolume (total e de células coradas em verde ou vermelho), altura do biofilme e cobertura do substrato pelo biofilme. Os testes estatísticos adequados serão selecionados e aplicados aos resultados obtidos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Folha de rosto, orçamento, cronograma, documentos atestando ciência e concordância dos laboratórios onde o estudo será realizado, cálculo do tamanho amostral e TCLE foram apresentados.

As modificações relativas ao TCLE e cálculo de tamanho amostral foram realizadas conforme recomendação do CEP.

Os pesquisadores incluíram o cartaz que será utilizado para recrutamento e o mesmo está em condições de aprovação.

Recomendações:

Sem recomendações adicionais.

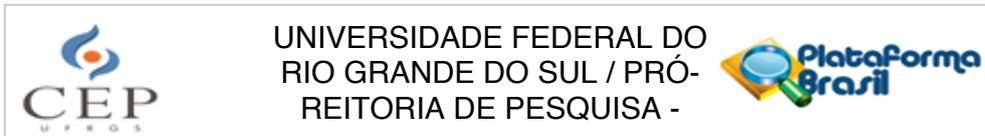
Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O parecer é pela aprovação.

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado.

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro
Bairro: Farroupilha **CEP:** 90.040-060
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3308-3738 **Fax:** (51)3308-4085 **E-mail:** etica@propesq.ufrgs.br



Continuação do Parecer: 1.445.853

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_631252.pdf	22/01/2016 11:57:50		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_apos_diligencia.pdf	22/01/2016 11:55:10	Patrícia Maria Poli Kopper Móra	Aceito
Outros	Resposta_a_pendencia.pdf	22/01/2016 11:53:06	Patrícia Maria Poli Kopper Móra	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	25/11/2015 23:49:52	Patrícia Maria Poli Kopper Móra	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Parecer_COMPESQ.jpg	24/11/2015 09:23:28	Patrícia Maria Poli Kopper Móra	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	LABIM.jpg	23/11/2015 17:10:45	Patrícia Maria Poli Kopper Móra	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	CME.jpg	23/11/2015 17:10:28	Patrícia Maria Poli Kopper Móra	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_placa.pdf	23/11/2015 17:07:27	Patrícia Maria Poli Kopper Móra	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_doador.pdf	23/11/2015 17:06:14	Patrícia Maria Poli Kopper Móra	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PORTO ALEGRE, 10 de Março de 2016

Assinado por:
MARIA DA GRAÇA CORSO DA MOTTA
(Coordenador)

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro
Bairro: Farroupilha **CEP:** 90.040-060
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3308-3738 **Fax:** (51)3308-4085 **E-mail:** etica@propesq.ufrgs.br

ANEXO C – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PESQUISA CLÍNICA

Elaborado com base na Resolução 196/1996 do Conselho Nacional de Saúde, Publicada no DOU No 201, 1996.

Estudo: “ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE CIMENTOS QUE CONTÊM SILICATO DE CÁLCIO EM DENTINA INFECTADA POR BIOFILME ORAL FORMADO ‘IN SITU’”

Instituição: Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Odontologia
Área de Endodontia

Pesquisadores: Profa. Dra. Patrícia Maria Poli Kopper Móra
Alexander Pompermayer Jardine
Ramiro Martins Quintana
Ivana Maria Zaccara Cunha Araújo
Prof. Dr. Francisco Montagner

Paciente: _____ **Código:** _____

Este trabalho tem o objetivo de estudar a atividade antimicrobiana de materiais em contato com microrganismos formados na boca. Com esse trabalho espera-se auxiliar os cirurgiões-dentistas e pesquisadores a determinar o cimento de uso endodôntico que mais adequado para o objetivo do tratamento endodôntico: manter ou restaurar a saúde dos tecidos que envolvem o dente.

Não são esperados desconfortos para o paciente voluntário à participar da pesquisa. Os desconfortos esperados poderão ser aqueles resultantes do procedimento de extração do dente, e que podem ocorrer independentemente da participação no estudo. Não há riscos previsíveis associados à pesquisa, e portanto não há previsão de indenização.

Você terá toda a liberdade de pedir esclarecimentos sobre o projeto de pesquisa a qualquer momento, podendo ou não concordar em participar.

Caso você não queira participar do estudo, não haverá prejuízo ao seu tratamento, o qual será prosseguido normalmente. Se você se recusar a participar ou quiser desistir, em qualquer fase da pesquisa, não será penalizado e não haverá prejuízo ao seu tratamento ou acompanhamento após a cirurgia, o qual continuará normalmente.

Apesar dos resultados serem divulgados publicamente para fins acadêmicos e científicos, a sua privacidade será preservada (seu nome não será revelado) quanto aos dados confidenciais que possam ser envolvidos na pesquisa.

A pesquisa não acarretará nenhum gasto previsível.

Eu _____ *certifico que, tendo lido as informações acima e suficientemente esclarecido (a) de todos os itens pelos*

pesquisadores, estou plenamente de acordo com a doação do dente que foi extraído para a realização do experimento.

Declaro que também fui informado que se houverem dúvidas quanto a questões éticas, poderei entrar em contato com o CEP-UFRGS através do telefone (51) 3308 4085.

Deste termo de consentimento livre esclarecido, serão geradas duas vias, sendo uma direcionada ao voluntário e a outra para o pesquisador.

Porto Alegre, ____ de _____ de 2015.

Nome do voluntário

Nome do pesquisador

Caso em que o sujeito de pesquisa analfabeto.

Este formulário foi lido para _____ em
____/____/____ pelo _____ enquanto eu estava presente.

Nome da testemunha: _____

Assinatura da testemunha: _____

Data: ____/____/____

ATENÇÃO: Toda e qualquer dúvida no decorrer do estudo poderá ser esclarecida pelos envolvidos nesta pesquisa através do telefone (51) 3308 5191. O pesquisador Profa. Dra. Patrícia Maria Poli Kopper Móra estará sempre a disposição para esclarecimentos. A sua participação em qualquer tipo de pesquisa é voluntária. Em caso de dúvida quanto aos seus direitos, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa UFRGS, endereçado a Av. Paulo Gama, 110 - 7° andar - Porto Alegre/RS - CEP: 90040-060 - Fone: (51) 3308.3738. E-mail: pro-reitoria@propesq.ufrgs.br.

ANEXO D – METODOLOGIA DETALHADA

Este estudo teve como objetivo avaliar a ação antimicrobiana de alguns cimentos de uso endodôntico que contêm silicato de cálcio, sendo eles Neo MTA Plus (Avalon Biomed, Bradenton, FL, USA), Biodentine (Septodont, Saint Maur des Fossés, France) e MTA Angelus (Angelus, Londrina, PR, Brazil). Para isso, foi utilizado um modelo de biofilme multi-espécies microcosmo, com formação inicial “in situ” e maturação “in vitro”. A análise da ação antimicrobiana foi realizada a partir da coloração com corante Live/Dead e microscopia confocal à laser (CLSM). Além disso, imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram capturadas das amostras para a análise da morfologia dos microrganismos presentes no biofilme.

Para isso, 56 blocos de dentina foram confeccionados a partir da porção cervical de raízes de dentes humanos (unirradiculares, com um único canal, sem reabsorções internas ou externas, sem lesões de cárie e sem tratamento endodôntico prévio) doados para este estudo. Os dentes foram cortados utilizando disco dupla-face diamantado Extec (Extec, Enfield, CT, USA), em cortadeira de precisão Isomet 2000 (Buehler, Lake Bluff, IL, USA), a 300 rpm sob refrigeração. Os blocos possuíam dimensões padronizadas de 4 mm de altura, 4 mm de profundidade e 5 mm de largura. E possuíam um sulco central que incluía o canal radicular de 1mm de largura por 3 mm de profundidade. Após cortados, os blocos foram limpos através da imersão em solução de hipoclorito de sódio 1% (Biodinâmica Química e Farmacêutica, Ibiporã, PR, Brazil) por 15 minutos, havendo a troca da solução a cada 5 minutos. Em seguida, foram imersos em EDTA 17% (Biodinâmica Química e Farmacêutica, Ibiporã, PR, Brazil) por um período de 5 minutos. Após esses procedimentos, os blocos foram esterelizados em autoclave à 121°C, 1 atm, por 15 minutos. Após, 2 dos blocos foram imersos em meio de cultura *brain-heart infusion* (BHI) (KASVI, Curitiba, PR, Brazil) para o controle do processo de esterilização.

Seis alunos de pós graduação em Odontologia (sendo 3 homens e 3 mulheres), com hábitos semelhantes de alimentação e higiene oral, foram voluntários deste estudo. Os voluntários eram não fumantes, não possuíam doenças sistêmicas e não realizaram antibiótico terapia nos 3 meses prévios ao estudo ou durante o mesmo. Cada um teve a arcada dentária superior moldada com alginato, e

foram confeccionados modelos de gesso. Sobre estes modelos foram confeccionadas aparelhos intra-orais semelhantes à placas de Hawley, onde foram incluídos os blocos de dentina. Cada voluntário utilizou 9 blocos de dentina por um período de 72 horas. Durante este período, os voluntários deveriam remover os aparelhos apenas para realizar a alimentação e a higiene oral e, enquanto isso, os aparelhos deveriam ser mantidos envoltos por gaze umedecida.

Após o período de 72 horas, os blocos foram removidos dos aparelhos e inseridos em placas de de cultura celular de 24 poços (TPP, Trasadingen, SH, Switzerland). Cada amostra foi devidamente identificada conforme o voluntário. Cada bloco ficou imerso em 5 ml de BHI (KASVI, Curitiba, PR, Brazil) e mantido em estufa à 37°C, em condições de aerobiose, por 21 dias. A cada 24 horas, foi realizada a troca de 3 ml de BHI. Ao final do período de 21 dias, as amostras foram irrigadas com 1 ml de água destilada estéril para a remoção do meio de cultura.

Neste momento, as amostras foram divididas entre os grupos experimentais, conforme o material-teste, controle negativo ou metodologia de análise do biofilme. Assim, foram estabelecidos os grupos teste: Neo MTA Plus (n=12), Biodentine (n=12) e MTA Angelus (n=12); o grupo controle negativo (n=12); e o grupo de análise do biofilme por MEV (n=6). Cada voluntário contribuiu aleatoriamente com 2 amostras para os grupos testes e controle; e com 1 amostra para o grupo MEV.

Sobre os blocos de dentina dos grupos teste, foram posicionadas amostras de cimento correspondentes aos respectivos grupos. Cada amostra amostra de cimento possuía dimensões de 5mm de diâmetro por 2 mm de altura e era circundada por um molde plástico circular. Os cimentos foram manipulados conforme as especificações de cada fabricante. Os grupos controle negativo e MEV permaneceram sem contato com cimento. O conjunto bloco+cimento ou o bloco de dentina individualmente foi mantido parcialmente imerso em BHI, ficando o meio de cultura na altura na interface entre o bloco e o cimento, a fim de evitar a solubilização do material teste no meio de cultura. Assim, cada poço de cultura contendo as amostras possuía 3 ml de BHI. As placas foram mantidas por 7 dias, em estufa à 37°C, em condições de aerobiose. E foi realizada a troca de 1 ml de meio de cultura a cada 24 horas.

Após o período de 7 dias, os blocos de dentina e os cimentos teste foram separados e levados, juntamente com as amostras do grupo controle negativo, para

o Centro de Microscopia e Microanálise (CMM) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) para a análise da ação antimicrobiana dos cimentos por meio de Microscopia confocal à laser. Para isso, foram utilizados os corantes SYTO 9 e Iodeto de propídio do kit de viabilidade bacteriana Live/Dead L-13152 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). O SYTO 9 tem a capacidade de corar em verde todas as células presentes no biofilme; enquanto o Iodeto de propídio cora em vermelho somente as células com danos na membrana plasmática. Os corantes foram preparados diluindo as ampolas contendo os corantes em pó em um total de 10 ml de água destilada. Sobre cada amostra de dentina ou cimento foram colocados 10 µl de solução do corante, por 5 minutos, ficando em ambiente com iluminação controlada. O pequeno volume de corante dispensado sobre as amostras limita a coloração do substrato de dentina ou cimento das amostras, dando melhores condições para análise da imagem.

As amostras foram, então, analisadas utilizando microscópio confocal à laser Olympus FluoView 1000 (Olympus, Tokyo, Japan), com uma magnificação de 60X. A distância entre cada uma das imagens adquiridas pelo confocal foi determinada em 1 µm. E foram geradas imagens com resolução de 512 X 512 pixels. De cada bloco de dentina, seja dos grupos teste ou controle negativo, foi realizada a captura de 4 “stacks”, ou imagens, aleatórias. De cada bloco de cimento, por sua vez, foram capturados 2 *stacks*.

As imagens da CLSM foram analisadas utilizando o programa bio Image_L (The MathWorks, Natick, MA, USA), desenvolvido pelo Dr. Chávez de Paz, que vem sendo amplamente utilizado nas análises de imagens de CLSM de biofilme. Primeiramente foi utilizada a ferramenta Label images. Assim, cada um dos stacks foi transformado em imagens formato TIFF, nomeados conforme a amostra e foram determinados a primeira e a última imagem a ser analisadas; excluindo imagens que apresentavam exclusivamente substrato de dentina ou cimento. Em seguida, as imagens foram analisadas utilizando a ferramenta Biofilm analysis, que permite a quantificação do biovolume de células vivas e mortas presentes no biofilme.

Foi determinado um fator de redução de ruídos da imagem de 0.1, um tamanho de imagem de 212.2 µm e um *z-step* (ou distância entre as imagens de stack) de 1 µm. Essa ferramenta, portanto, produz uma tabela compatível com o Excel, na qual quantifica, entre outras coisas, a % de células vivas (ou coradas em

verde) presentes no biofilme, em cada uma das imagens constituintes do *stack*. Essa coluna de valores foi copiada e colada em uma outra tabela contendo os 4 grupos de análise por confocal. Cada planilha continha 12 colunas correspondentes às 12 amostras. Cada coluna, portanto, recebeu os valores % de células vivas dos 4 ou 6 stacks capturados de cada amostra. Ao final, foi calculada a média deste valores, determinando a % média de células vivas presentes em cada amostras dos grupos teste e controle negativo.

Por outro lado, paralelamente a análise por confocal, foi realizada a análise da morfologia dos microrganismos presentes nas amostras de biofilme, através de MEV. Assim, as 6 amostras do grupo MEV (cada uma correspondente a 1 voluntário da pesquisa) foram metalizadas com ouro e submetidas a análise em Micriscópio Philips XL 30 (Philips, Amsterdam, Netherlands). Foram capturadas imagens aleatórias da superfície do bloco de dentina com magnificação de 5000X e voltagem de 25 kV.

A análise estatística foi realizada nos dados da ação antimicrobiana, obtidos a partir da análise por CLSM. Para isso, foi utilizado o programa estatístico GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Os dados submetidos ao teste Kolgomorov-Smirnov, tiveram sua normalidade constatada. Portanto, foi aplicado o teste One-way ANOVA, seguido do post-hoc de Tukey. O nível de significância foi estabelecido em $P < .05$. As imagens de MEV foram submetidas apenas a uma análise descritiva, a respeito da morfologia dos microrganismos presentes no biofilme.