



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

Felipe Barros Matoso

**CARACTERIZAÇÃO TAXONÔMICA DE UM BIOFILME MULTIESPÉCIES
FORMADO *IN SITU* E AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE BACTERIANA EM
CANAIS RADICULARES SUBMETIDOS A DIFERENTES PROTOCOLOS
DE DESINFECÇÃO**

Porto Alegre/RS

2021

Felipe Barros Matoso

**CARACTERIZAÇÃO TAXONÔMICA DE UM BIOFILME MULTIESPÉCIES
FORMADO *IN SITU* E AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE BACTERIANA EM
CANALIS RADICULARES SUBMETIDOS A DIFERENTES PROTOCOLOS
DE DESINFECÇÃO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Clínica Odontológica com ênfase em Endodontia

Área de concentração: Clínica Odontológica/
Endodontia

Linha de Pesquisa: Biomateriais e técnicas
terapêuticas em Odontologia

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

Porto Alegre/RS

2021

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Felipe Barros Matoso

**CARACTERIZAÇÃO TAXONÔMICA DE UM BIOFILME MULTIESPÉCIES
FORMADO *IN SITU* E AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE BACTERIANA EM
CANALIS RADICULARES SUBMETIDOS A DIFERENTES PROTOCOLOS
DE DESINFECÇÃO**

Esta tese de doutorado foi julgada adequada para a obtenção do título de “**Doutor em Clínica Odontológica**”, Área de Concentração: Endodontia, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Porto Alegre/RS, 01 de Junho de 2021.

Prof. Dr. Fabrício Mezzomo Collares
(Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Odontologia)

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Patrícia Maria Poli Kopper Móra (Orientadora) - UFRGS

Prof. Dr. Rodrigo Alex Arthur (Titular) - UFRGS

Prof^a. Dr^a. Daiana Elisabeth Böttcher (Titular) – PUC-RS

Prof^a. Dr^a. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes (Titular) - UNICAMP

Prof^a. Dr^a. Roberta Kochenborger Scarparo (Suplente) - UFRGS

*E assenta-te no último lugar.
Jesus (Lucas, 14:10)*

A Deus, inteligência suprema e causa primária de todas as coisas, pela presença constante e bondade em todos os momentos de dificuldade.

Aos meus pais, Rita e Cleber, que mesmo distantes se mantêm presentes. São minha fonte de inspiração e meu primeiro contato com a profissão. Obrigado pelo incentivo constante ao meu aprimoramento intelectual. Todo meu respeito e carinho. Amo vocês!

Ao Stanley e família, pelos momentos de cumplicidade, amor, companheirismo e paciência durante estes anos dedicados ao meu aprimoramento intelectual. Nem sempre foi fácil abrir mão do tempo em família. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À **Profª Drª Patrícia Maria Poli Kopper Móra**, mais que uma Orientadora, uma amiga, acolhedora, capaz de junto aos seus orientados construir momentos de afeição, amizade e união que ficarão para sempre na minha caminhada. Este momento reflete o sentimento de admiração pela tua conduta pessoal e profissional. Uma inspiração para o começo de uma jornada docente com muita honra de ser parte da sua equipe de orientados. Obrigado por tudo. Este momento não é de encerramento, mas do início de uma grande parceria acadêmica porvir e também de descontrações futuras. Conte sempre comigo.

Aos Professores, **Profª Dra Fabiana Grecca, Prof. Dr. Francisco Montagner e Prof Dr. Pabulo Henrique Rampelotto**, que se dedicaram na realização e condução das etapas intelectuais e laboratoriais permitindo com que este trabalho fosse viabilizado.

Aos demais **Professores de Endodontia da FO-UFRGS**, Prof. Dr. Regis Bursmeister dos Santos, Prof. Dr. Ricardo Abreu da Rosa, Prof Dr. Marcos Vinícius Reis Só, Profª Dra. Simone Bonato Luisi, Prof Dr. Tiago André Fontoura de Melo, Prof. Dr. José Antônio Poli de Figueiredo pelo profissionalismo, disponibilidade e conhecimento compartilhado. A todos os **Professoroes do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UFRGS**.

Aos **Professores Doutores Rodrigo Alex Arthur, Daiana Elisabeth Böttcher, Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes, e Roberta Kochenborger Scarparo**, por aceitarem o convite de participar da minha banca, e por serem exemplos de comprometimento à ciência.

Aos **colegas de turma de Doutorado, Alexander Jardine, Camila Grock, Júlia Iglesias, Lucas Pinheiro, Luciana Luz e Ramiro Quintana** que fizeram desta etapa mais leve e muito contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional.

À **Profª Dra Débora Delai Costa, Profª Dra Paula Barcelos, Profª Patrícia Inês Chaves, e Profª Mariele Pradebon** pela parceria e amizade adquirida em seus tempos de pós-graduandas, amizade estas que cultivo ao longo da minha jornada com

muito respeito e admiração.

A todos os **colegas de pós-graduação, Mestrado e Doutorado** das demais áreas da Odontologia que muito contribuíram proporcionando momentos especiais durante esta jornada.

Aos colegas professores do curso de Especialização em Endodontia do IEAPOM, Edson Pelisser, Eder Tartaroti, Marcio Rech e Letícia Mestieri pela paciência nos momentos em que eu não podia me fazer presente.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À **Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)**, uma instituição de ponta que é referência no país, onde pude realizar os estágios de docência que me trouxeram uma experiência inenarrável. Sinto orgulho de fazer parte desta história.

À **Coordenação do Programa de Pós-graduação em Odontologia da FO-UFRGS**, cumprimento ao **Prof. Dr. Fabricio Mezzomo Collares**, e todos os seus laboratórios e funcionários, em especial CMM e LABIM, que viabilizaram parte da execução desse trabalho nas suas dependências (Anexos A e B).

Minha gratidão a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram com esse trabalho e com a minha formação, que me incentivaram a ir em frente, a ser uma pessoa batalhadora e perseverante, buscando ser melhor a cada dia. Levo cada um no coração!

*“Ensinar não é transferir conhecimento,
mas criar as possibilidades para sua
produção ou construção. Quem ensina
aprende ao ensinar e quem aprende,
ensina ao aprender”.*
(Paulo Freire)

MATOSO, Felipe Barros. **Caracterização taxonômica de um biofilme multiespécies formado *in situ* e avaliação da viabilidade bacteriana em canais radiculares submetidos a diferentes protocolos de desinfecção.**

110f. Tese (Doutorado em Clínica Odontológica com ênfase em Endodontia) – Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre (RS), 2021.

RESUMO

Objetivos: Caracterizar um biofilme multiespécies formado *in situ* através de sequenciamento de DNA de alto rendimento (NGS) e avaliar sua viabilidade após o emprego de diferentes protocolos de desinfecção. **Metodologia:** Setenta e duas raízes palatinas de molares superiores foram selecionadas. Para contaminação por biofilme multiespécie (n=72), foram confeccionados 20 dispositivos intrabucais, dois para cada voluntário (n=8). Dois voluntários utilizaram os dispositivos duas vezes em momentos distintos. Após a utilização dos dispositivos por 21 dias, uma raiz foi usada para caracterização taxonômica do biofilme por meio do NSG (n=10) e as demais distribuídas em cinco grupos testes (n=10): PUI - Irrigação Ultrassônica Passiva, EC - Easy Clean, XPF - XP-endo Finisher, aPDT – Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana, CI – Irrigação convencional e um grupo controle sem intervenção (CT). A descrição das características do biofilme foi realizada por meio de ferramentas de bioinformática. A viabilidade microbiana foi avaliada em imagens de microscopia confocal a laser com auxílio do BioImage L e o percentual de células viáveis foi comparado entre os grupos ($\alpha \leq .05$). **Resultados:** Foram identificadas 562 OTUs, que pertencem a 93 gêneros, 44 famílias e 8 filos. A colonização bacteriana foi diferente para cada biofilme e as amostras não apresentaram o mesmo grupo de bactérias predominantes. Alguns padrões gerais de agrupamento de amostras foram observados e um microbioma central de OTUs e gêneros prevalentes foi identificado. Em toda a extensão do canal radicular, não houve diferença entre os protocolos de desinfecção ($p > .05$) e EC, PUI e aPDT apresentaram redução na viabilidade celular quando comparados ao CT ($p < .05$). **Conclusões:** Biofilmes produzidos *in situ* demonstraram ser heterogêneos, com alguns padrões de diversidade, o que parece assemelhar-se às comunidades microbianas presentes em infecções endodônticas. EC, PUI e aPDT tiveram efeitos ecológicos significativos no biofilme intrarradicular multiespécie induzido *in situ*, quando comparados com amostras sem tratamento.

Palavras-chave: Biofilme, microbioma oral, preparo do canal radicular, terapia fotodinâmica, 16S rRNA

ABSTRACT

Objectives: To characterize a multi-species biofilm formed *in situ* through next-generation sequencing (NGS) and to evaluate its viability after the use of different disinfection protocols. **Methodology:** Seventy-two palatal roots of maxillary molars were selected. For contamination by multispecies biofilm (n = 72), 20 intraoral devices were made, two for each volunteer (n = 8). Two volunteers used the devices twice at different times. After using the devices for 21 days, one root was used to characterize the biofilm using the NSG (n = 10) and the others were distributed in five test groups (n = 10): PUI - Passive Ultrasonic Irrigation, EC - Easy Clean, XPF - XP-endo Finisher, aPDT - Antimicrobial Photodynamic Therapy, CI - Conventional irrigation and control group without intervention (CT). - The description of the biofilm characteristics was carried out using bioinformatics tools. Microbial viability was assessed using confocal laser microscopy images with the aid of BioImage L and the percentage of viable cells was compared between groups ($\alpha \leq .05$). **Results:** Five hundred and sixty-two OTUs were identified, belonging to 93 genera, 44 families and 8 phyla. The bacterial colonization was different for each biofilm and the samples did not present the same group of predominant bacteria. Some general patterns of sample clustering were observed and a central microbiome of OTUs and prevalent genera was identified. In the entire length of the root canal, there was no difference between the disinfection protocols ($p > .05$) and EC, PUI and aPDT showed a reduction in cell viability when compared to CT ($p < .05$). **Conclusions:** Biofilms produced *in situ* proved to be heterogeneous, with some patterns of diversity, which seems to be similar to the microbial communities present in endodontic infections. EC, PUI and aPDT had significant ecological effects on multispecies intraradicular biofilm formed *in situ*, when compared with untreated samples.

Key Words: Biofilm, oral microbiome, root canal preparation, photodynamic therapy, 16S rRNA

LISTA DE FIGURAS

Manuscrito 1:

Figure 1. Figure 1. Schematic drawing of intraoral device. A) Right side; B) Left side; and C) Diagram illustrating NGS DNA extraction, 16S rRNA gene amplification, sequencing and bioinformatics.

Figure 2. Relative abundance of the 8 prevalent phyla (A), families (B) and genera (C) in samples.

Figure 3. Relative abundance of families.

Figure 4. Prevalence of OTUs in interquartile per phylum.

Figure 5. A) PCoA analysis based on Bray-Curtis dissimilarity; B) Alpha diversity analysis using Shannon index; C) Alpha diversity using Chao1 index.

Manuscrito 2:

Figure 1 – 3-D reconstructions (biovolume) of biofilm population showing viable (green) / nonviable (red) cells according to third and experimental group.

LISTA DE TABELAS

Manuscrito 1:

Table 1 - Number of OTUs distribution in relation to the prevalence (%) in samples.

Table 2 – Prevalence (%) and abundance (%) of genus always abundant taxa (>1%) in samples.

Table S1. Number of OTUs in each genus within each phylum per sample (n) and frequency of abundant species (>1% of OTUs) in each sample (S).

Manuscrito 2:

Table 1 - Additional disinfection protocols according to experimental group.

Table 2 – Median percentage (25th and 75th percentiles) of viable cell biovolume to total biovolume in experimental and control groups.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|---------------|---|
| # | - Número |
| aPDT | - Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana / <i>Antimicrobial Photodynamic Therapy</i> |
| CME | - Centro de Microscopia Eletrônica |
| CSLM | - Microscopia confocal de varredura a laser / <i>Confocal Scanning Laser Microscope</i> |
| CT | - Comprimento de trabalho |
| EC | - Easy Clean |
| EDTA | - Ácido etilenodiamino tetra-cético |
| FO | - Faculdade de Odontologia |
| LABIM | - Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Bucal |
| MEBV | -Microscopia eletrônica de baixo vácuo |
| mL | - Mililitro |
| mm | - Milímetro |
| NaOCl | - Hipoclorito de sódio |
| NGS | -Sequenciamento de DNA de alto rendimento / <i>Next-Generation Sequencing</i> |
| NiTi | - Níquel-Titânio |
| OTU | - Operational taxonomic unit |
| PCoA | - Principal coordinates analysis |
| PUI | - Irrigação Ultrassônica Passiva / <i>Passive Ultrasonic Irrigation</i> |
| PQM | - Preparo químico-mecânico |
| UFRGS | - Universidade Federal do Rio Grande do Sul |
| XPF | - XPendo Finisher |
| WL | - <i>Working Length</i> |
| μm | - Micrometro |
| % | - Percentual |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| RESUMO..... | 9 |
| ABSTRACT..... | 10 |
| LISTA DE FIGURAS | 11 |
| LISTA DE TABELAS..... | 12 |
| LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS | 13 |
| 1 INTRODUÇÃO..... | 16 |
| 2 OBJETIVOS..... | 26 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL..... | 26 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 26 |
| 3 MANUSCRITO 1: VERSÃO EM INGLÊS..... | 27 |
| 4 MANUSCRITO 2: VERSÃO EM INGLÊS..... | 61 |
| 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 80 |
| 6 REFERÊNCIAS..... | 81 |
| 7 APÊNDICES..... | 91 |
| APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.. | 92 |
| APÊNDICE B - TERMO DE DOAÇÃO DE DENTES HUMANOS..... | 95 |
| 8 ANEXOS | 96 |
| ANEXO A- CARTA DE AUTORIZAÇÃO DO USO DAS DEPENDÊNCIAS DO CENTRO DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA (CME) DA UFRGS. | 97 |
| ANEXO B - CARTA DE AUTORIZAÇÃO DO USO DAS DEPENDÊNCIAS DO LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA E MICROBIOLOGIA BUCAL (LABIM) DA UFRGS..... | 98 |
| ANEXO C- AUTORIZAÇÃO DO AMBULATÓRIO DE CIRURGIA E TRAUMATOLOGIA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UFRGS..... | 99 |

| | |
|--|------------|
| ANEXO D - UNIDADE DE PESQUISA LABORATORIAL DO CENTRO DE PESQUISA EXPERIMENTAL DO HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE | 100 |
| ANEXO F - CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP) DA UFRGS..... | 101 |

1 INTRODUÇÃO

Os microrganismos organizam-se na cavidade oral e no sistema de canais radiculares na forma de biofilme, sendo capazes de sobreviver a condições ambientais adversas (MORSE, 1981; SANTOS et al., 2011). Tal resistência é, em parte, devido à proteção oferecida pela matriz extracelular do biofilme que permite o aprisionamento de nutrientes e a cooperação metabólica entre várias bactérias residentes de espécies iguais ou diferentes (NEELAKANTAN et al., 2017).

A cavidade oral compreende muitas superfícies, cada uma delas coberta com uma profusão de bactérias (AAS et al., 2005). Mais de 700 espécies bacterianas ou filotipos, das quais mais de 50% não foram cultivadas, foram ali detectadas, caracterizando o conhecido biofilme bacteriano (AAS et al., 2005). Algumas dessas bactérias têm sido identificadas em doenças orais, tais como cárie e periodontite, que estão entre as infecções polimicrobianas mais comuns em humanos (AAS et al., 2005, LAMONT, KOO & HAJISHENGALLIS 2018; MOSADDAD et al., 2019). As infecções endodônticas também são comuns e sua causa está relacionada a microorganismos provenientes da cavidade oral (ROLPH et al., 2001). Com uma origem polimicrobiana, os estudos vêm demonstrando o importante papel desta comunidade no desenvolvimento das infecções do sistema de canais radiculares e perirradicular (SIQUEIRA JR et al., 2000; SIQUEIRA JR; RÔÇAS, 2005a; SHIN et al., 2018; BARBOSA-RIBEIRO et al., 2020).

Os métodos de cultura, que empregam meios de crescimento artificiais, tem sido empregados há mais de um século (FERRER-LUQUE et al., 2021; MORSE, 1981; SWIMBERGHE et al., 2019). Entretanto, os meios de cultura artificiais possuem limitações para o crescimento microbiano, tais como: falta de nutrientes ou de fatores de crescimento; toxicidade; estímulo a produção de substâncias inibidoras do microorganismo alvo por outras espécies presentes; dependência metabólica de outras espécies para o crescimento microbiano; e, favorecimento do estado de dormência bacteriana (SIQUEIRA JR; RÔÇAS, 2005b).

Em contrapartida, os métodos moleculares de identificação microbiana permitem a detecção não apenas de espécies cultiváveis, mas também de espécies ou cepas microbianas não cultiváveis. Além disso, têm maior especificidade e identificação precisa de cepas microbianas com comportamento fenotípico ambíguo,

incluindo cepas divergentes ou convergentes; permitem a detecção de espécies microbianas diretamente de amostras clínicas, sem a necessidade de cultivo; têm maior sensibilidade; oferecem um diagnóstico rápido, o que é particularmente vantajoso em casos de doenças potencialmente fatais ou causadas por microrganismos de crescimento lento; não requerem condições anaeróbias cuidadosamente controladas durante a amostragem e transporte, o que é vantajoso, uma vez que bactérias anaeróbias fastidiosas e outros microrganismos frágeis podem perder a viabilidade durante o trânsito; podem ser realizados durante o tratamento antimicrobiano; e, quando um grande número de amostras deve ser pesquisado em estudos epidemiológicos, as amostras podem ser armazenadas e analisadas de uma só vez (SIQUEIRA JR; RÔÇAS, 2005b; LAMONT, KOO & HAJISHENGALLIS 2018).

A técnica de sequenciamento de alto rendimento (NGS) é um método molecular de sequenciamento de DNA utilizada para investigar o microbioma oral humano. No campo da endodontia, permite a caracterização da microbiota de canais infectados (MANOIL; AL-MANEI; BELIBASAKIS, 2020). Esta técnica apresenta uma taxa de erro muito baixa e está indicada para estudos metagenômicos e genômicos (PEDRÓS-ALIÓ, 2012).

Siqueira Jr. e Rôças (2005b) salientam que os métodos moleculares possuem algumas limitações que fazem com que ainda não sejam empregados de maneira rotineira nos estudos que objetivam a identificação de microrganismos em infecções endodônticas. Pedrós-Alió, (2012) relata que uma das limitações da técnica NGS é o comprimento das leituras, que fornece muitos números de fragmentos muito curtos a moderadamente longos, o que pode impactar na identificação taxonômica subestimando a diversidade de espécies. Outra limitação da técnica, é ser capaz de identificar não somente células viáveis, mas também de detectar DNA livre originado de células mortas (MANOIL; AL-MANEI; BELIBASAKIS, 2020). Apesar disso, as tecnologias que envolvem o sequenciamento de alto rendimento são uma valiosa ferramenta para detectar microbiotas altamente diversas associadas às infecções endodônticas, demonstrando comunidades composicionalmente inespecíficas, mas com abundância diferente para cada tipo de infecção endodôntica (MANOIL; AL-MANEI; BELIBASAKIS, 2020).

Quando métodos moleculares de identificação microbiana são possíveis de realização, o emprego de ferramentas computacionais (bioinformática), que descrevem e analisam essas comunidades microbianas, permitem um aumento na

capacidade de sequenciamento, promovendo um maior detalhamento do comportamento da comunidade microbiana (SCHLOSS et al., 2009). O VSEARCH é uma das ferramentas com 64 bits de código aberto e gratuita para processar e preparar dados de sequência de nucleotídeos metagenômica, genômica e genômica populacional (ROGNES et al., 2016).

Além disso, a classificação taxonômica da comunidade bacteriana da cavidade oral por amplificação direcionada e sequenciamento do gene 16S rRNA permite que a diversidade de arqueias e bactérias encontradas no microbioma oral, já amplamente catalogada, exerça um papel fundamental na associação entre saúde e doença (WADE; PROSDOCIMI, 2020). O aprimoramento das técnicas moleculares voltadas à identificação microbiana permite uma maior fidelização da comunidade bacteriana causadora das infecções endodônticas além de permitir a identificação de microrganismos que não são cultiváveis em técnica de cultura celular e que nunca foram encontradas anteriormente em infecções endodônticas (GOMES et al., 2015; ROLPH et al., 2001; SIQUEIRA JR et al., 2000a; SIQUEIRA JR; RÔÇAS, 2005b, 2005a).

Os microrganismos encontrados nas infecções endodônticas são diversos, sendo a maior parte composta por anaeróbios estritos e menor parte por anaeróbios facultativos (ROLPH et al., 2001; SIQUEIRA JR; RÔÇAS; LOPES, 2002). Há uma vasta composição microbiana na análise molecular de gêneros bacterianos para infecções endodônticas primárias: Anderson et al. (2013) encontraram 277 gêneros diferentes, sendo *Streptococcus*, *Prevotella*, *Lactobacillus*, *Kocuria*, *Neisseria* e *Enterococcus* os mais abundantes; TZANETAKIS et al. (2015) mostraram que os gêneros mais abundantes foram *Bacteroidaceae_unclassified*, *Pyramidobacter* e *Parvimonas*; e, OZOK et al. (2012) encontraram os gêneros *Streptococcus*, *Parvimonas*, *Fusobacterium*, *Neisseria* e *Rothia* em maior abundância. Esta variação do microbioma endodôntico pode estar relacionada com as mudanças de fatores ambientais como a disponibilidade de nutrientes e tensão de oxigênio na cavidade oral e dentro do canal radicular (SWIMBERGHE et al., 2019).

A colonização bacteriana do sistema de canais radiculares se encontra usualmente, em sua maioria, em suspensão na fase fluida do canal. Contudo, grandes aglomerações de células bacterianas são encontradas aderidas às paredes do sistema de canais radiculares, formando um conjunto de microrganismos e matriz extra-celular, semelhantes a biofilmes multicamadas e multiespécies (NAIR;

RAMACHANDRAN NAIR; NAIR, 1987; SIQUEIRA JR; RÔÇAS; LOPES, 2002). Os microrganismos organizados em forma de biofilmes multiespécies apresentam uma maior resistência contra antissépticos e antibióticos (CHÁVEZ DE PAZ et al., 2015; CHÁVEZ DE PAZ, 2012) e comumente são encontrados em dentes com lesão periapical. 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 (FARIA-JÚNIOR et al., 2013; SIQUEIRA JR; RÔÇAS; LOPES, 2002).

RICUCCI; SIQUEIRA JR (2010), demonstraram que a presença de biofilme bacteriano no interior do sistema de canais radiculares está relacionada com o estabelecimento da periodontite apical, sendo esta relação descrita tanto para casos de infecção primária quanto infecção secundária ou persistente.

FERREIRA et al. (2006), utilizando a técnica de hibridização DNA-DNA para identificação do biofilme formado em lesões periapicais induzida em cães, observaram predominância de bactérias anaeróbias estritas e gram negativas. Também foi constatado que tanto o Hipoclorito de sódio 5,25% quanto a Clorexidina gel 2%, associados ao EDTA 17%, são eficazes na redução dos microrganismos qualitativa e quantitativamente. Constataram também que existe uma relação direta entre tamanho do dente e tamanho da lesão, sendo que quanto menor o dente, menor o tamanho da lesão e menor presença de microrganismos.

Essas comunidades bacterianas apresentam-se resistentes ao preparo químico-mecânico (PQM), podendo ser responsáveis pelo fracasso da terapia endodôntica (HAAPASALO et al., 2010). Por esse motivo, ao final do PQM, tem sido preconizada, na literatura, um protocolo de descontaminação adicional dos canais radiculares (CHOPRA; MURRAY; NAMEROW, 2008; JOY et al., 2015; SIMEZO et al., 2017).

Atualmente, há disponível no mercado alguns equipamentos e instrumentos de uso endodôntico para agitação da solução irrigadora ao final do preparo que têm como objetivo promover maior limpeza dos canais radiculares. Vários estudos têm sido desenvolvidos para avaliar a eficácia dos diferentes protocolos (AMATO et al., 2011; BAO et al., 2017; KATO et al., 2016; KFIR et al., 2018; MACEDO et al., 2014; PAQUÉ; BOESSLER; ZEHNDER, 2011; YEUNG et al., 2014). Contudo, não há um consenso na literatura sobre o protocolo ideal.

O potencial da ativação ultrassônica passiva das soluções irrigadoras, após a conclusão do PQM, já está bem estabelecido na literatura, uma vez que aumenta a remoção da smear layer em áreas inacessíveis do canal radicular (JOY et al., 2015; KATO et al., 2016; LEONI et al., 2017; PASSARINHO-NETO et al., 2006). Na constante busca por protocolos que melhorem a sanificação do sistema de canais radiculares (ANDREANI et al., 2021; KATO et al., 2016), novos instrumentos têm sido lançados no mercado. O XP-endo Finisher (FKG Dentaire, La Chaux-de-Fonds, Switzerland) e o Easy Clean (Easy Equipamentos Odontológicos, Belo Horizonte/MG, Brasil) têm como finalidade proporcionar uma agitação da solução irrigadora no final do preparo, potencializando sua ação de limpeza.

Para estudar a efetividade antimicrobiana dos diferentes protocolos de limpeza final do canal radicular, alguns autores utilizam um modelo monoespécie, como o *Enterococcus faecalis* (BÖTTCHER et al., 2015; DE ALMEIDA et al., 2016). Estudos monoespécies e duplo-espécies simplificam o fenômeno ecológico e não representam um reflexo verdadeiro dos resultados alcançáveis no cenário clínico. Por isso, estudos que reproduzam a complexidade do biofilme microbiano e bem como modelos para avaliar a remoção da biomassa dos canais radiculares são importantes (NEELAKANTAN et al., 2017), simulando a condição clínica dos tratamentos endodônticos de dentes com necrose pulpar.

Outro ponto importante é o método de análise empregado para a verificação da redução microbiana após diferentes protocolos de limpeza dos canais radiculares. Observa-se na literatura diferentes metodologias (BAO et al., 2017). Alguns dos estudos utilizam métodos envolvendo halos de inibição ou contagem de unidades formadoras de colônias (DE ALMEIDA et al., 2016); em outros, o recurso da microscopia confocal de varredura a laser (CSLM) tem sido utilizado (CHÁVEZ DE PAZ et al., 2015; JARDINE et al., 2018). A avaliação direta por meio da CSLM apresenta vantagens uma vez que possibilita a quantificação dos microorganismos viáveis e não viáveis e a avaliação da estrutura tridimensional do biofilme, aderido à parede de dentina (CHÁVEZ DE PAZ, 2009; SHEN; STOJICIC; HAAPASALO, 2010).

JOY et al. (2015) avaliaram a eficiência de duas técnicas de limpeza - instrumentação ultrassônica passiva (PUI) e estática - na eliminação de um biofilme bacteriano simulado a partir de solução colágena orgânica obtida do colágeno da calda de ratos. Os autores verificaram que após a PUI foi mais eficaz na remoção do biofilme do que o protocolo tradicional.

PAQUÉ; BOESSLER; ZEHNDER, (2011) analisaram a quantidade de debris acumulados após o preparo químico mecânico. Verificaram que o acúmulo de smear layer estava presente em várias áreas do canal radicular e que a instrumentação associada a irrigação com seringa manteve 6.9% do volume do canal com restos de detritos. Observaram também que após irrigação com EDTA 17%, ocorreu uma redução de detritos para 4.9% e que com o uso da PUI a quantidade reduziu para 3.7%. Na média geral, a redução de detritos após irrigação com EDTA 17% e PUI foi de 50.8%, indicando que metade da sujidade promovida durante a instrumentação não foi completamente removida.

KATO et al. (2016) investigaram a limpeza de irregularidades artificiais, por meio da microscopia eletrônica de varredura de baixo vácuo (MEVBV), após o emprego de duas técnicas de limpeza final: GI- ativação ultrassônica passiva (PUI) e GII- ativação mecânica com EasyClean (EC). Em ambos os grupos foram realizadas 3 etapas de limpeza final. Etapa a: a ativação foi por 3 ciclos de 20 segundos, com aspiração e reposição do líquido a cada ciclo, totalizando 1 minuto; etapa b: o canal foi aspirado e preenchido com EDTA 17%, repetindo-se a mesma sequência e tempo da primeira etapa; etapa c: repetiu-se os procedimentos da primeira etapa e realizou-se lavagem final com 20 ml água destilada. O sistema mecânico EC demonstrou melhor capacidade de remoção de debris no terço apical do canal radicular quando comparado ao sistema PUI. A utilização da MEVBV demonstrou ser eficaz, com grandes vantagens para a análise comparativa, permitindo comparação direta entre os grupos, diminuindo ou eliminando variáveis não desejáveis quando se utiliza a observação com microscopia eletrônica de varredura tradicional.

Apesar do potencial para remoção da smear layer pelo dispositivo Easy Clean comprovado por KATO et al., (2016), em estudos recentes foi observado não haver diferença significativa na remoção de debris e smear layer entre técnicas de agitação de solução, incluindo o XP-endo Finisher, comparado a técnicas de agitação manual (ANDREANI et al., 2021; MACHADO et al., 2021) e também a Irrigação Ultrassônica Passiva (MACHADO et al., 2021). O efeito do XP-endo Finisher também já foi verificado frente a um biofilme de *Enterococcus faecalis* (SASANAKUL; AMPORNARAMVETH; CHIVATXARANUKUL, 2019; VILLALTA-BRIONES et al., 2021). Porém estes estudos não verificam a eficiência destes dispositivos frente a um biofilme multiespécies.

Avaliando os efeitos erosivos da PUI e da irrigação com ativação recíprocante

do instrumento EasyClean sobre a superfície dentinária do canal radicular, SIMEZO et al. (2017) observaram que o PUI e o sistema de irrigação EasyClean mostraram-se iguais em termos de erosão dentinária. No entanto, os autores salientam que o instrumento EC, diferentemente do empregado na irrigação ultrassônica passiva, pode ser mantido no comprimento de trabalho para um maior contato da solução irrigante com as paredes do canal em todo o seu comprimento.

A fim de testar a remoção da pasta de hidróxido de cálcio do interior dos canais radiculares, WIGLER et al. (2017) compararam a eficiência de 3 métodos em 68 incisivos inferiores. As raízes foram clivadas longitudinalmente e um sulco longitudinal, com 3mm de comprimento, 0,2mm de largura e 0,5mm de profundidade foi realizado na superfície da dentina do canal radicular de uma das metades de cada espécime a uma distância de 2mm do ápice. Este sulco teve como objetivo simular uma irregularidade que não sofre instrumentação na porção apical e no qual os medicamentos intracanaís podem se acumular, dificultando sua remoção. Após a inserção do Ca(OH)_2 , as raízes foram reagrupadas e divididas em 3 grupos de acordo com a técnica para a remoção da pasta de hidróxido de cálcio: GI – XP-endo Finisher (XPF), GII – PUI e GIII – Agulha e seringa convencionais. Os autores observaram que nenhum grupo removeu completamente a pasta de Ca(OH)_2 , mas GI e GII tiveram melhores resultados, porém sem diferença estatística entre eles.

LEONI et al., (2017), avaliaram a eficácia de quatro protocolos de limpeza final (Pressão Positiva Apical - APP; PUI; Instrumento Auto Ajustável- SAF; XPF) na redução de debris acumulada dentro do sistema de canais radiculares, por meio da análise em micro-CT. Os autores verificaram que os grupos PUI e XPF obtiveram maior média de reduções percentuais de debris (94,1% e 89,7%, respectivamente) em comparação com os grupos APP e SAF (45,7% e 41,3%, respectivamente) ($P < 0,05$). Estes achados concordam com KFIR et al., (2018) que, em trabalho similar, avaliaram a eficiência destes mesmos instrumentos na remoção do Ca(OH)_2 .

Uma particularidade no trabalho de KFIR et al., (2018) é o aquecimento da solução de NaOCl 4% a 37°C. De acordo com KOLLI et al. (2018) o instrumento XPF sofre alterações com a temperatura corporal (>35°C). Este instrumento quando inserido no canal radicular muda da fase martensítica (reta) para a fase austenítica (memória), melhorando sua eficiência de limpeza, podendo alcançar áreas de difícil acesso com instrumentos padrão. Assim, em trabalhos *in vitro*, a influência da variação da temperatura na eficiência do instrumento deve ser considerada.

BAO et al., (2017), avaliaram a eficácia do XPF na remoção de biofilme oral multiespécie coletado de placa subgengival e cultivado *in vitro* em comparação com a irrigação convencional (CNI) e PUI usando um modelo de dente infectado com um sulco apical artificial. As três técnicas de limpeza (CNI, PUI e XPF) foram realizadas com irrigação contínua e com irrigação em 3 etapas. A quantidade de biofilme residual dentro e fora do sulco foi avaliada em MEV. O hipoclorito de sódio 3% (5mL) e EDTA (4mL) foram empregados para irrigação dos canais. Os autores concluíram que o XPF mostrou-se eficaz na remoção do biofilme do canal principal, bem como do sulco artificial. O protocolo intermitente de 3 etapas foi mais eficiente do que o protocolo contínuo em todos os grupos testados.

NOGUEIRA et al. (2021) avaliaram a efetividade do EC, PUI e Irrigação Sônica na descontaminação do canal radicular infectado com *E. faecalis* pelo método de Unidade Formadora de Colonias e observaram que todos os protocolos foram eficientes na redução da viabilidade do *E. faecalis* e ainda que não houve diferença entre os grupos.

Além dos métodos revistos de agitação das soluções irrigadoras, vários sistemas a laser têm sido pesquisados como coadjuvantes nos procedimentos de desinfecção dos condutos radiculares (NAGAI et al., 2018). A literatura tem mostrado que o laser, através da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (aPDT) pode ser capaz de atingir áreas inacessíveis como região de istmos, canais laterais e túbulos dentinários (MANG; TAYAL; BAIER, 2012; MEIRE et al., 2009; NAGAI et al., 2018).

A aPDT utiliza uma luz com um comprimento de onda específico que atua através da ativação de um corante fotoativo não tóxico denominado de fotosensibilizador (FS) gerando espécies reativas de oxigênio (KONOPKA; GOSLINSKI, 2007). A eliminação de microrganismos promovida pela aPDT ocorre da seguinte forma: (1) o agente fotossensibilizador se liga a membrana celular do microrganismo, (2) a irradiação luminosa, com um comprimento de onda específico, combinada com o pico de absorção do fotossensibilizador, leva à formação de oxigênio singleto (altamente reativo) e (3) o oxigênio singleto causa a morte bacteriana pela destruição de sua parede celular (KOMINE; TSUJIMOTO, 2013). Entretanto, a relação entre a quantidade de oxigênio singleto e o seu efeito antibacteriano ainda não está bem estabelecida.

Bactérias planctônicas são significativamente mais sensíveis à aPDT do que as bactérias em forma de biofilme (TRINDADE et al., 2015). Nesse sentido, vários

sistemas foto ativados (Leds e Lasers) têm sido pesquisados como coadjuvantes nos procedimentos de desinfecção dos condutos radiculares, apresentando resultados promissores (NAGAI et al., 2018; PINHEIRO et al., 2016; ROSA et al., 2017; TRINDADE et al., 2015). Entretanto, ainda não há um protocolo de aplicação dos sistemas fotoativos bem estabelecido, sendo necessárias novas investigações para que a previsibilidade do uso da terapia fotodinâmica antimicrobiana na Endodontia seja adequadamente estabelecida.

Existem diferentes protocolos recomendados pelos fabricantes dos diferentes aparelhos de laser disponíveis no mercado. De acordo com o fabricante do LASER DUO (MMOptics, São Carlos, SP, Brasil), previamente a aplicação da luz deve-se preencher o canal com azul de metileno 0,005% deixando-o agir por 2 minutos. A seguir, a luz deve ser aplicada, por meio de uma fibra óptica, realizando-se movimentos de vai e vem, de apical para cervical, durante 180 segundos.

Entretanto, assim como não há uma orientação do fabricante, também não há um consenso na literatura sobre o comprimento em que a fibra óptica do Laser deve atuar. Há autores que preconizam seu emprego no comprimento de trabalho (BORSATTO et al., 2015; PINHEIRO et al., 2016; SILVA et al., 2012) ou 2mm aquém (MUHAMMAD et al., 2014).

De acordo com o estudo de KOMINE; TSUJIMOTO, (2013) a concentração ideal de azul de metileno necessária para proporcionar a maior liberação de oxigênio singleto e, por consequência, os melhores efeitos antibacterianos varia entre 0,001% e 0,01%. Sendo assim, os autores que investigam a efetividade do aPDT têm empregado diferentes protocolos e metodologias, variando a concentração do corante, seu tempo de ação bem como o comprimento de onda e o tempo de exposição à luz, dificultando a comparação dos resultados.

ROSA et al., (2017) analisaram o efeito antibacteriano e a dissolução de biofilmes mono (*E. faecalis*) e multiespécie (formado *in situ*) promovido pela aPDT associada com o hipoclorito de sódio 2,5% ou com a clorexidina. Como corante fotossensibilizador os autores utilizaram o azul de metileno 0,01% por um minuto e a ativação do Laser (Therapy XT, DMC, 660nm; potência: 1000mW) foi realizada por 60s. A análise do grupo monoespécie foi realizada pela contagem de unidades formadoras de colônia. A avaliação do biofilme multiespécie foi realizada em microscopia confocal de varredura a laser, obtendo-se o valor de biovolume total, biovolume de células viáveis e o porcentual de células viáveis em relação às não

viáveis. A terapia fotodinâmica associada aos irrigantes reduziu a carga bacteriana em canais infectados com *E. faecalis* e reduziu a quantidade e o volume de células viáveis do biofilme multiespécie, mas não foi capaz de reduzir o volume total de células bacterianas. Além disso, o menor biovolume de células viáveis foi observado quando o aPDT foi associado ao hipoclorito de sódio 2,5%.

NAGAI et al., (2018) avaliaram o efeito bactericida, por meio da contagem de unidades formadoras de colônia, da aPDT em um modelo de dentina infectada com *Streptococcus mutans*. Para tanto, a dentina foi previamente sensibilizada com azul de metileno ou azulencianina, ambos 0,01%, por 5 minutos. Após o aparelho de laser foi acionado com comprimento de onda de 650nm e 100mW de potência (PAD Light) ou 940nm e 1500mW (eZlase – Biolase, Irvine, CA, EUA). O tempo de ativação foi de 60s e a aPDT mostrou-se mais eficaz associada ao azul de metileno, independentemente do comprimento de onda utilizado.

Sendo assim, considerando o objetivo do tratamento endodôntico – de promover a saúde dos tecidos perirradiculares através do controle da infecção do sistema de canais – e percebendo na literatura a carência de estudos para avaliar o comportamento de um biofilme multiespécies intraradicular formado *in situ*, cabe aprofundar o conhecimento a respeito das características destes biofilmes polimicrobianos bem como da sua suscetibilidade a diferentes protocolos de limpeza do canal radicular.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar taxonomicamente um biofilme multiespecies intrarradicular formado *in situ* e avaliar sua viabilidade bacteriana em canais radiculares após o emprego de diferentes protocolos de limpeza.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Descrever as comunidades microbianas em relação a sua abundância relativa e diversidade encontradas em amostras de um biofilme intrarradicular multiespecies formado *in situ*, pelo método de sequenciamento de DNA de alto rendimento e análise de bioinformática.

b) Avaliar a viabilidade bacteriana, por meio de microscopia confocal de varredura a laser, de um biofilme intrarradicular multiespecies formado *in situ*, em canais radiculares submetidos a protocolos de limpeza do canal radicular com ativação da solução pela irrigação ultrassônica passiva (PUI), pelo emprego do XP-endo Finisher (XPF) ou do Easy Clean (EC) ou com o uso da técnica da aPDT.

3 MANUSCRITO 1: Versão em Inglês

O artigo a seguir intitula-se “**Microbial composition and diversity in intraradicular biofilm formed *in situ*: new concepts based on next-generation sequencing**”, formatado segundo as normas específicas da revista Archives of Oral Biology (fator de impacto 1.931, Qualis A1, Área de Odontologia, CAPES) a qual será submetido.

Matoso FB, Montagner F, Grecca, FS, Rampelotto PH, Kopper PMP



Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Dentistry Post Graduate Program

June, 2021

Dear Editor,

We are submitting the original article “**Microbial composition and diversity in intraradicular biofilm formed *in situ*: new concepts based on next-generation sequencing**” which we would like you to consider for publication in the Archives of Oral Biology.

The manuscript has not been submitted to any other journals, and will not be submitted elsewhere while under consideration by the Archives of Oral Biology.

This manuscript focuses to characterize multispecies biofilms formed *in situ*, using next-generation sequencing and bioinformatics analysis. We performed innovative and important experiments that analyze the microbial composition and diversity in root canal using aiming to reproduce clinical conditions for *in vitro* studies. Our findings open the perspective to laboratory studies to evaluate protocols for local infection control in root canal treatment.

All authors declare that they have no conflicts of interest. In addition, all authors have read and approved the manuscript as submitted, are qualified for authorship, believe the submission represents honest work and take full responsibility for the reported findings.

We look forward to hearing from you regarding the status of our manuscript. In the meantime, please feel free to contact us if you need any additional information.

Sincerely,

Patrícia Maria Poli Kopper

*Corresponding author

Patrícia Maria Poli Kopper

School of Dentistry, Federal University of Rio Grande do Sul - UFRGS
Rua Ramiro Barcelos, 2492 - CEP 90035-003 - Porto Alegre – RS – Brazil

Phone: 55 51 3308 5191

patricia.kopper@ufrgs.br

Microbial composition and diversity in intraradicular biofilm formed *in situ*: new concepts based on next-generation sequencing.

Felipe Barros Matoso^a, Francisco Montagner^{a,b}, Fabiana Soares Grecca^{a,b}, Pabulo Henrique Rampelotto^{c,d}, Patricia Maria Poli Kopper^{a,b,*}

a Programa de Pós-graduação em Odontologia, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

b School of Dentistry, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil.

c Laboratório Experimental de Hepatologia e Gastroenterologia (LEHG), Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, RS, Brazil.

d Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana (LABRESIS), Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, RS, Brazil.

*** Corresponding author:**

Patricia Maria Poli Kopper

School of Dentistry, Federal University of Rio Grande do Sul.

Rua Ramiro Barcelos, 2492. Porto Alegre, Brazil.

E-mail address: patricia.kopper@ufrgs.br

Phone: +55 (51) 3308 5023

Authors' contact information:

Felipe Barros Matoso – prof.felipebarrosmatoso@gmail.com

Francisco Montagner – francisco.montagner@ufrgs.br

Fabiana Soares Grecca – fabiana.grecca@ufrgs.br

Pabulo Henrique Rampelotto - prampelotto@hcpa.edu.br

Patrícia Maria Poli Kopper - patricia.kopper@ufrgs.br

Acknowledgments

The authors deny any conflict of interest.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

Funding: None.

Running title: *in situ* biofilm composition and diversity

Credit authorship contribution statement:

Felipe Barros Matoso: Conceptualization; Methodology; Formal analysis, Data curation; Writing – original draft and review & editing.

Francisco Montagner: Formal analysis, Data curation, Writing; Supervision.

Fabiana Soares Grecca: Methodology, Formal analysis, Writing – review.

Pabulo Henrique Rampelotto: Methodology; Formal analysis, Data curation, Writing -review.

Patricia Maria Poli Kopper: Conceptualization; Formal analysis, Data curation; Writing - original draft and review & editing; Project administration; Supervision.

Highlights

- *In situ* formed biofilms in root canals closely resembles the diversity from the primary endodontic infections.
- Different individuals allowed for obtaining distinct microbial communities in root canals *in situ*.
- Systemic and local conditions of the participants may be considered to better understand their effect on microbial communities in biofilms produced *in situ*.

Microbial composition and diversity in intraradicular biofilm formed *in situ*: new concepts based on next-generation sequencing.

Abstract

Objective: To taxonomic characterize an intraradicular multispecies biofilms formed *in situ*, using next-generation sequencing (NGS) and bioinformatics.

Design: The palatal root of maxillary molars were prepared. Ten intraoral prosthetic devices with lateral slots were fabricated. The roots were positioned at the slots with the canal access to the oral cavity. Eight volunteers, two at two different time points, used the devices for 21 days for biofilm formation and maturation. After, one root of each device was removed and stored at -20° C until the moment of DNA extraction and sequencing (n=10). Biofilm analysis was performed through NGS and bioinformatics. The V4 hyper-variable region of the 16S rRNA gene was amplified and sequenced. The Mothur pipeline was used for 16S rRNA processing and subsequent analyses of the sequence dataset were performed in R.

Results: Taxonomy-based analysis of bacterial communities identified 562 OTUs, which belong to 93 genera, 44 families, and 8 phyla. The bacterial colonization was different for each biofilm and samples did not have the same group of predominant bacteria. Despite the heterogeneity among samples, some general patterns of sample clustering were observed for alpha and beta diversity analysis. In addition, a core microbiome of prevalent OTUs and genera were identified.

Conclusions: Intraradicular biofilms formed *in situ* were heterogeneous when individually analyzed, but some diversity patterns were observed after sample clustering. The experimental model in this study seems to resemble the development of biofilms in endodontic infections and may be used to evaluate disinfection protocols.

Keywords: Biofilms; Oral Microbiome; Next-generation sequencing; 16S rRNA; Intraoral device; bioinformatics.

Introduction

Oral microbiota is a complex, highly heterogeneous ecological community consisting of a microbiome of bacteria, archaea, protozoans, fungi and viruses (Mosaddad et al., 2019). The human mouth is, therefore, a natural laboratory, with a variety of substrates whose chemistry, topography and stability provide different habitats for microbial populations (Welch et al., 2020). Some factors, such as age and oral habitats, are determinant in the phylogenetic structure of this microbial population (Xu et al., 2015).

Although any microorganisms in the oral microbial community may infect the root canal system, canals have a more selective environment, and their colonization will depend on the cooperative and sometimes antagonistic relationships between bacteria within the canal (Mosaddad et al., 2019). Therefore, the pulp cavity has specific groups of bacteria, not usually found in other oral niches such as saliva and supragingival biofilm (Moraes et al., 2020).

When homeostasis between the host and the resident microbiome is lost, a parasitic relationship dominates (Mosaddad et al., 2019) and dental caries may progress to the pulp cavity forming a distinct and characteristic community in the root canal system (RCS). This community will be fed by the different types of nutrients and exchanged products, such as disintegrated connective tissues and bacterial byproducts, and may eventually lead to pulp and periapical diseases (Chávez De Paz, 2012; Sundqvist, 1992).

Bacteria that colonize the RCS are usually in suspension in the canal. However, a high number of bacterial cells may be adhered to the walls of the RCS, forming a cluster of microorganisms and an extracellular matrix similar to that of multilayer and multispecies biofilms (Nair et al., 1987; Siqueira Jr et al., 2002). Therefore, biofilms in root canals are also more complex and organized. This organized biofilm internal compartmentalization allows bacteria that have different growth requirements to survive in their own microenvironments (Neelakantan et al., 2017).

Microorganisms organized in multispecies biofilms are more resistant to antiseptics and antibiotics (Chávez de Paz et al., 2015; Chávez De Paz, 2012). This type of biofilm may be found on the dentinal walls, in dentinal tubules, in

anatomic irregularities of the RCS and on the external surface of the root canal apex (Faria-Júnior et al., 2013; Siqueira Jr et al., 2002). Its removal during cleaning and shaping is, therefore, extremely challenging (Neelakantan et al., 2017), and its viability after treatment may contribute for endodontic failure (Haapasalo et al., 2010; Neelakantan et al., 2017).

Most studies using *in vitro* laboratory root canal biofilm models have cultured monospecies biofilms (Swimberghe et al., 2019). However, they may oversimplify this ecological phenomenon and not be a true representation of the results that may be achieved in clinical practice (Neelakantan et al., 2017). The present study taxonomic characterized an intraradicular multispecies biofilm, formed *in situ* by a new model aiming to reproduce clinical conditions in laboratorial studies, using next-generation sequencing (NGS) and bioinformatics. The null hypothesis was that *in situ* formed biofilms in root canal system have similar diversity composition then *in vivo*.

Methods

This *in situ* study was approved by the Ethics in Research Committee of the Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil (CAAE: 01688918.8.0000.5347) and registered on SISGEN (Protocol A09C4B7).

Twelve extracted maxillary molars with closed apex and without internal resorption or endodontic treatment were stored in 0.001% NaOCl at 4° C until use. Palatal roots were sectioned close to the cemento-enamel junction to prepare standard 17-mm-long samples. Roots were included if a #20 K-file (Sirona Dentsply, York, PA, USA) could be run along all the canal and be juxtaposed to the canal walls.

For root canal preparation, working length was determined visually at 1 mm short of the foramen, and a glide path was established using an Easy ProDesign Logic 25.01 file (Easy Equipamentos, Belo Horizonte, MG, Brazil). After that, an Easy ProDesign Logic 25.06 file (Easy Equipamentos Odontológicos, Belo Horizonte, MG, Brazil) was used for cleaning and shaping according to manufacturer's instructions. The instruments were used in a rotary movement using a VDW Silver system (VDW GmbH, Munich, Germany) and the

DR's choice program for individual speed and torque settings. Torque was 100 g.cm² at 350 rpm for the 25.01 file and 400 g.cm² at 950 rpm for the 25.06 file. Before and after each instrument, the canals were irrigated with 2 mL of distilled water using a disposable plastic syringe (Ultradent Products Inc., South Jordan, UT, USA). An aspiration cannula and a silicone capillary tip (Ultradent Products Inc., South Jordan, UT, USA) were used for aspiration during irrigation.

After canal preparation, the roots were sectioned longitudinally using a low-speed diamond saw (Labcut 1010, EXTEC, Enfield, CT). The internal surface of each half was polished using 120-, 280- and 400-grit wet sandpaper strips (Norton, Guarulhos, SP, Brazil). After that, the samples were cleaned in an ultrasonic bath with 20 mL of an enzymatic detergent (Tween® 80, SIGMA, Saint Louis, MO, USA) for 3 cycles of five minutes each. The detergent was replaced after each cycle. Then, a cycle of five minutes with 10 mL of EDTA (Biodinâmica, Ibiporã, PR, Brazil) was performed.

The samples were autoclaved for 30 min at 121°C and 1 atm and then individually immersed in Falcon tubes (MyLabor, São Paulo, SP, Brazil) containing 5 mL of distilled water. Two roots selected randomly to control sterility were kept in Brain-Heart Infusion Broth (BHI) (KASVI, Curitiba, PR, Brazil) for 24 h at 37° C. There was no turbidity in the culture medium after that time.

Eight volunteers of both genders aged 21 to 35 years were invited to participate in the study and to use the intraoral prosthetic devices for the *in situ* formation of intraradicular multispecies biofilms. The criteria for volunteer selection was: no caries, gingivitis or periodontal disease; no smoking; not using orthodontic devices; not undergoing tooth bleaching; no local or systemic disease; not taking any type of chronic medication; not having used any antimicrobial drugs in the two months before and during the use of the device. Two volunteers used the devices at two different time points, totalizing ten samples (one from each volunteer at each time point) for biofilm characterization.

For the fabrication of the intraoral prosthetic devices, impressions of the maxillary arch of the volunteers were taken, casts were prepared and then, the devices were fabricated using transparent self-curing acrylic resin (Jet, Artigos Odontológicos Clássico, São Paulo, SP, Brazil). The devices had lateral slots for the placement of the roots. The two halves of the roots were fastened with an

archwire, and the root apex was sealed with utility wax. After that, the roots were placed and fastened with stainless steel wires to the slots fabricated on the acrylic device. The root canal access faced the occlusal plane, and the long axis of the root was parallel to the long axis of the volunteer's teeth. A layer of acrylic resin was used for fixation, leaving the cervical third of the root free. The devices were polished with burs and pumice (KG Sorensen Indústria e Comércio Ltda., Barueri, SP, Brazil), with special attention to their edges and surface irregularities to avoid irritation and bacterial plaque accumulation, which may eventually affect gingival tissues. Three roots were fixed in the right side of the device, and four in the left side (Figure 1A and B).

The devices were installed slightly underneath the occlusal plane, allowing proper mastication. They were used for 21 days (Yang et al., 2016). During this time, the volunteers removed them from the mouth and stored in humid gauze only to eat and for dental hygiene. After that, only one sample from each volunteer, at each time point, was selected randomly, removed from the device and stored at -20°C for biofilm analysis using high-throughput DNA sequencing (n=10).

DNA extraction and sequencing

For the isolation of microbial DNA, dentin chips were collected from the glide path along all the length of the root canal on both halves of the root using a #4 carbide bur (Angelus, Londrina, Brazil). The chips collected were processed using a QIAamp DNA Micro Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. For each sample, 180 μl of ATL buffer and 20 μl of proteinase K solution were added. The tubes were then agitated for 1 minute and incubated in a water bath at 56°C for 30 minutes. After that, 200 μl of AL buffer was added, samples were agitated for 1 minute and then kept in a water bath at 70°C for 10 minutes. Impurities and lipids were removed with the addition of 200 μl of ethanol. The tube contents were transferred to silica purification columns and then centrifuged at 8000 rpm for 1 minute. After that, the liquid in the lower part of the column was removed. As microbial DNA was bound to the silica filter, a buffer was used to wash it additional times: 500 μl of wash buffer AW1 was added, and the filters were centrifuged at 8000 rpm for 1 minute. Then, the wash buffer AW2 was added to the upper part of the filter, which was centrifuged one more time, at 13000 rpm for 3 minutes. For DNA elution from the microfilter, 100

µl of AE buffer was added and kept in contact with it for 3 minutes before final centrifugation at 8000 rpm for 1 minute to obtain purified microbial DNA. The amount of purified microbial DNA was measured, and its purity grade was determined by spectrophotometry (NanoDrop, Thermo Scientific, DE).

The hypervariable V4 region from the rRNA gene was amplified by PCR using the following primer pair: 515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3') and 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'). To pool different samples in the same reaction, the primer-fusion method was used, and each sample had a distinct barcode attached to the corresponding PCR product. The purified products were subjected to emulsion PCR using Ion PGM™ Hi-Q™ view OT2 kit (Thermo Fisher Scientific, USA). After that, the resulting enriched beads were sequenced in an Ion Torrent PGM System (Thermo Fisher Scientific, USA) using Ion PGM™ Hi-Q™ view sequencing kit (Thermo Fisher Scientific, USA).

Bioinformatics analysis

The sequence data exported from the Ion Torrent system was processed using a custom pipeline in Mothur v.1.44.3 (Schloss et al., 2009). Initially, sequences were depleted of barcodes and primers, and no mismatch was allowed. Then a quality filter was applied to eliminate low-quality reads. Quality control was conducted by trimming low-quality reads, those with incorrect length, and those containing an ambiguous base or homopolymers longer than 8 bp. All potentially chimeric sequences were identified and removed using VSEARCH (Rognes et al., 2016).

After initial quality filtering and trimming, the remaining sequences were clustered into operational taxonomic units (OTUs) based on a 99% identity level and were classified against the SILVA v132 reference database at 97% similarity (Quast et al., 2013). Sequences that could not be classified (i.e., unknown sequences), as well as sequences identified as eukaryotes, mitochondria, and chloroplasts were removed before further analysis.

An additional filtering step was performed by removing OTUs with less than 10 reads to reduce spurious OTUs resulting from PCR or sequencing errors. The OTU table was then normalized using the cumulative sum scaling (CSS)

method. For alpha diversity analysis, the OTU table was rarefied to the smallest library size. Subsequent analyses of the sequence dataset were performed in R v. 4.0 using *vegan*, *phyloseq*, *ggplot2*, and *MicrobiomeAnalystR* packages.

Alpha-diversity was assessed using Chao1 and Shannon indexes. Principal coordinates analysis (PCoA) was conducted for overall comparisons of significant differences between bacterial communities, to estimate beta diversity. The ANOSIM multivariate test was run on the distance matrix to obtain statistical confidence for the sample grouping observed by PCoA. Additional differences between microbial communities were compared using clustering methods based on Bray-Curtis dissimilarity. The results of hierarchical clustering were illustrated using heatmaps and dendrograms. Each genus was categorized in always abundant (>1%), conditionally abundant or rare (1-0.1%), conditionally rare (0.1-0.01%) and rare taxa (<0.01%) (Nyirabuhoro et al., 2020), depending on its relative proportion in the bacterial community.

Results

Taxonomy-based analysis of bacterial communities generated a total read counts of 684232, an average counts per sample of 68423, a maximum counts per sample of 102402, a minimum counts per sample of 46095 and identified 562 OTUs, which belong to 93 genera, 44 families, and 8 phyla (Figure 2). *Proteobacteria* (43%) and *Firmicutes* (38%) were the most prevalent phyla in all samples (Figure 2A), followed by *Actinobacteria* (8%), *Bacteroidetes* (7%), and *Fusobacteria* (5%). *Epsilonbacteraeota*, *Patescibacteria* and *Tenericutes* were present in less than 1% of samples. The most abundant families were *Streptococcaceae* (19%), *Xanthomonadaceae* (13%), *Neisseriaceae* (9%), *Pseudomonadaceae* (8%), and *Moraxellaceae* (8%) (Figure 2B). These five families represented 57% of all observed taxa. The distribution of the 44 families also exhibited interesting features, as illustrated in Figure 3, which indicates that there is a different predominant abundant community for each sample. Therefore, the bacterial colonization was different for each sample and samples did not have the same group of predominant bacteria.

The prevalence of OTUs in interquartile per phylum is presented in Figure 4. The 1st quartile was composed of OTUs of genera that were found in 10-20% of the samples, the second, in 30-50%, the 3rd, in 60-70%, and the 4th, in 80-100%. The *Spirochaetes* and *Tenericutes* phyla only have OTUs in the 1st quartile. The *Epsilonbateraceota* and *Patescibacteria* have only one and two OTUs in the samples, but their frequency is high.

The great majority of the OTUs found were present in 50% or less of the samples (397 OTUs of 562). Only 38 OTUs were found in 100% of the samples. The remaining 122 OTUs were found between 60 and 90% of the samples (Table 1). The distribution of OTUs in different genera showed that most of them, i.e. 376 OTUs (66,9%), manifested in a rare way (<0.01%), 116 OTUs as conditionally rare (0.1-0.01%), 49 OTUs as conditionally abundant or rare (1-0.1%), and 21 OTUs always abundant (> 1%). Table S1 shows the distribution of always abundant (>1%) OTUs for each genus according to phylum for each sample. Table 2 summarizes the prevalence (%) and OTUs abundance (%) of genus always abundant (>1%). Eleven genera were found in 100% of the samples, two in 90%, one in 50% and two in 30% of the samples. *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* and *Streptococcus* showed more than 10% of its OTUs always abundant. The other genera had less than 6.5% of always abundant OTUs.

Despite the heterogeneity biofilm composition observed when samples were individually analyzed, some diversity patterns were observed after sample clustering. PCoA beta diversity analysis (Figure 5A) revealed three different groups ($p < .004$). The two samples used at different time points by two volunteers (volunteer 1: S1 and S7; volunteer 2: S2 and S8) were in different groups, and each behaved as a different specimen at each time point. Alpha diversity analyzed using the Shannon and Chao1 indices revealed two distinct groups (Figure 5B and 5C). For Shannon analysis, samples S1, S2, S3, S5, and S8 (Group 1) presented higher diversity than samples S4, S6, S7, and S9 (Group 2) ($p < 0.01$). Similar profile was found for Chao1 analysis, where samples S1, S2, S3, and S10 (Group 1) presented higher diversity than samples S4, S5, S6, S7, S8, and S9 (Group 2) ($p < 0.01$).

Discussion

The complex microbial communities on the root canal walls and in anatomic irregularities pose challenges for the proper cleaning and shaping procedures (Barbosa-Ribeiro et al., 2020; Siqueira Jr et al., 2000). Clinical observational studies have evaluated root canal disinfection protocols using traditional culture-based methods or analyses of bacterial nucleic acids (Carvalho et al., 2019; Swimberghe et al., 2019). Pre-clinical tests of antimicrobial protocols have been conducted using experimental methods with multispecies bacterial communities formed by *in vitro* co-cultivation, using bacterial strains or bacteria clinically isolated from infected canals (Chávez De Paz, 2012; Swimberghe et al., 2019; Teves et al., 2019). It is difficult to reproduce the complexity of the microbial communities isolated from the pulp cavity of teeth with endodontic infections (Chávez de Paz et al., 2003; Moraes et al., 2015). As experimental parameters used to induce multispecies biofilm models varied greatly (Swimberghe et al., 2019), the present study evaluated the microbial composition of biofilms formed *in situ*, inside the root canal of extracted teeth, using high-throughput sequencing, allowing for comparison with the complex microbial communities in intraradicular endodontic infections.

Root samples obtained after preparation and sterilization of extracted human teeth were inserted into removable devices that remained in the oral cavity of volunteers for three weeks. The literature do not provide any standardized time for samples to remain in the oral cavity of their participants, and times range from 30 min to 28 days (Abdullah et al., 2019). The effect of time on microbial succession in endodontic infections has already been demonstrated. Studies using microbial culture medium of samples of monkey's root canals (Moller et al., 1981) found that a microbial shift took place along seven months, which confirmed that strict anaerobic bacterial strains were predominant and that some microorganisms isolated in the initial samples were no longer found in the end. More recently, the influence of the evaluated niche in the bacterial communities profile was demonstrated by Park et al. (2020), using an animal model. It was observed that the pulp chamber had a greater diversity of bacterial species than the root canal. The microbiota of the apical portion of the root canal has become more complex over time. Therefore, distinct bacterial communities are associated

with the progression of apical pathologies (Park et al., 2020). Alves et al. (2009) also suggest that the coronary and apical thirds of the root canals had variations in the profile of the bacterial communities, which seem unique for each patient.

In situ studies impose challenges to the participant. The use of oral devices for extended periods may cause oral lesions and trauma to soft tissues. Biofilm formation can be complemented by additional laboratorial incubation. In the study conducted by (Barthel et al., 2002), a seven-day biofilm maturation phase in the laboratory was added to the *in situ* phase. However, sample transportation, culture and storage available in a laboratory do not accurately reproduced the nutritional and gaseous factors found in the pulp cavity inserted in a human oral cavity (Siqueira Jr & Rôças, 2005). These strategies can also induce selective pressure on the biofilms previously formed *in situ*. Velsko & Shaddox (2018) used next-generation sequencing on biofilms grown from healthy and disease-site subgingival plaque for 80 days to determine the stability and reliability of continuous oral biofilm growth over hydroxyapatite disks. Their model seems to be an interesting option, but it limits the capacity to evaluate the heterogeneous responses of microbial communities found in clinical situations. The laboratory cultivation of biofilm formed *in situ* may promote the growth of specific groups of bacteria and not others. Although the biofilm obtained may not have a similar structure and morphology to the one found in the pulp cavity of infected teeth, the experimental model used in this study allows the evolution of complex oral biofilms, including the presence of both abundant and low abundant species, which is essential for basic studies on the establishment and development of oral biofilms and for applied studies on the evaluation of efficient disinfection protocols.

Community behavior is dependent on its diversity (Siqueira Jr & Rôças, 2009a). Molecular methods identify a vast microbial diversity showing the complexity that may exist in endodontic infections (Siqueira Jr & Rôças, 2009a). Using these methods, new interactions of this community have emerged and started to be investigated from the perspective of species cluster (Siqueira Jr & Rôças, 2009a). The qualitative and quantitative analyses of the species found in biofilm in this study were conducted using high-throughput sequencing and refined bioinformatics analyses. This strategic methodology has already been

used in similar studies (Cieplik et al., 2019). NGS provides a systems-level overview for oral microbial communities, and high resolution bioinformatics sharpens understanding of site distinctiveness (Welch et al., 2019). The isolation of nucleic acids in this study precluded the analysis of biofilm in the same sample using techniques already described in the literature, such as scanning electron microscopy (Li et al., 2015), light microscopy (Peters et al., 2011) or confocal laser scanning microscopy (Chávez De Paz, 2012). Compositional and structural analyses could have been made using FISH combined with confocal laser scanning microscopy, but only the target species would be identified, and not all the members of the biofilm, as demonstrated in a study with samples of gutta-percha cones (Zehnder et al., 2017). Additional *in situ* and *in vivo* studies should address if different bacterial species behaved and interacted differently between each other in microcosmos biofilms.

The *in situ* formed biofilm have a microbial profile that closely resembles the primary endodontic infections. There is a predominance of OTUs of the *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes* and *Actinobacteria* phyla, whereas members of the *Spirochaetes* and *Tenericutes* phyla have OTUs in a smaller number of samples. Asymptomatic primary endodontic infections harbor species that belong to the *Proteobacteria* phylum, followed by the *Bacteroidetes* and *Firmicutes* phyla (Sánchez-Sanhueza et al., 2018). Persistent infections had a great frequency and microbial load of members of the *Proteobacteria* and *Tenericutes* phyla than primary infections (Tzanetakis et al., 2015).

Due to the lack of information in the literature, it is difficult to determine a strict genera similarity between the results of the present study and previous published reports. As observed herein, (Keskin et al., 2017) found that most of the identified OTUs in biofilms from primary endodontic infections were low abundant (<1%). Biofilms from asymptomatic primary endodontic infections also comprised *Streptococcus*, *Parvimonas*, *Fusobacterium*, *Neisseria* and *Rothia* in >1% abundance. (Ozok et al., 2012). Other studies reported that the abundant genus *Streptococcus*, *Fusobacterium*, *Granulicatella*, *Neisseria*, *Parvimonas*, *Gemella*, *Veillonella* had also been identified/detected in primary endodontic infections biofilms (Gomes et al., 2004; Keskin et al., 2017). However, the previous published reports did not specify whether they are abundant or rare.

The microbial communities associated with acute primary endodontic infections are different between patients, and the root canal and apical tissues promote microbial selection (Hsiao et al., 2012; Montagner et al., 2010; Shin et al., 2018). Environmental factors, nutrient availability and oxygen tension in the oral cavity and inside the root canal of the samples are fundamental for biofilm composition (Swimberghe et al., 2019). Changes in this environment, such as the interactions induced by the microbial community itself, the imbalance caused by treatment procedures, or by the host itself (hormonal changes, disease modifiers, etc.) are fundamental for the emergence of symptoms associate with an endodontic infection (Siqueira & Rôças, 2013).

The interaction between species can vary depending on the production of proteases, on the virulence of bacteria (Chávez de Paz et al., 2015), and even on bacteria with low abundance are important to be identified and in what proportions are present (Siqueira Jr & Rôças, 2009a). Alves et al. (2009) e Ozok et al. (2012) demonstrated that different ecological factors contribute to shape a community in individual roots, observing a high intra and inter-individual variability between the samples. In the present study, OTUs belonging to the genus *Streptococcus*, *Acinetobacter*, *Granulicatella*, *Fusobacterium*, *Neisseria*, *Neisseriaceae*, *Rothia*, *Parvimonas*, *Gemella*, *Veillonella* and to the families *Neissereaceae* and *Enterobacteriaceae* were detected in all the samples, comprising 38 OTUs with a relative abundance >1%. Siqueira Jr & Rôças, (2009) indicated that a select group of species is virtually always among the most frequently detected in well-conducted studies about the endodontic microbiota.

Analysis of all OTUs identified revealed that most are rare, which confirms the massive presence of low abundant taxa in the intraradicular biofilms formed *in situ*. Such profile reproduces clinical endodontic infections, as suggested by Moraes et al. (2020), who evaluated samples of the pulp cavity with symptomatic primary endodontic infections. Low abundant members have gained importance in microbial communities, especially after the development of high-throughput sequencing. Siqueira Jr & Rôças (2009) suggested that low abundance members might become dominant in response to environmental changes. Moreover, they may constitute dominant populations in one individual, but correspond to low abundance populations in another. Therefore, studies should be conducted to

understand the ecological mechanisms that support their existence and their role in the dynamics of microbial communities (Pedrós-Alió, 2012), particularly using techniques that evaluate their function (Moraes et al., 2020).

The samples from a single individual at different time points had distinct microbial communities, which seems to confirm that factors associated with the sample anatomy, and even with the patient at the time of biofilm induction, may modulate the microbial successions during biofilm formation. Therefore, environmental factors that modulate biofilm formation do not seem to be stable in a single participant at two different time points. Gomes et al. (1999) found variations in the microbial profile in a study using bacterial culture to examine similarities in bacterial content in dental root canals of a single patient treated at different time points. Those authors also suggested that morphological and functional similarities extend to the selective characteristics of the ecological niche, and that, therefore, the surviving dominant microflora inside the root canal may also be similar. Further studies should collect detailed information about the host's habits at different times of biofilm formation, enabling a better understanding of their influence in the different microbial communities of biofilms formed in the same host.

In summary, the experimental model in this study seems to promote the development of biofilm that includes the diversity previously reported in studies with clinical samples from endodontic infections. They may be used to evaluate protocols for local infection control in root canal treatment. It will enable future studies to analyze metabolic pathways and virulence factors associated with initial microbial communities and microbes that remain after disinfection.

Conclusions

Biofilms formed *in situ* in the root canal system of teeth extracted and inserted in intraoral appliances devices were heterogeneous when individually analyzed, but some diversity patterns were observed after sample clustering. The experimental model in this study seems to resemble the development of biofilms in endodontic infections. Studies that evaluate the effect of disinfection protocols

on biofilm should take into consideration such characteristics for their analyses of biofilm composition, structure, and function.

References

- Abdullah, N., Al-Marzooq, F., Mohamad, S., Abd Rahman, N., Ngo, C., & Samaranayake, L. P. (2019). Intraoral appliances for in situ oral biofilm growth: a systematic review. *Journal of Oral Microbiology*, *11*(1), 1647–1757. <https://doi.org/10.1080/20002297.2019.1647757>
- Alves, F. R. F., Siqueira, J. F., Carmo, F. L., Santos, A. L., Peixoto, R. S., Rôças, I. N., & Rosado, A. S. (2009). Bacterial community profiling of cryogenically ground samples from the apical and coronal root segments of teeth with apical periodontitis. *Journal of Endodontics*, *35*(4), 486–492. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2008.12.022>
- Barbosa-Ribeiro, M., Arruda-Vasconcelos, R., Louzada, L. M., dos Santos, D. G., Andreote, F. D., & Gomes, B. P. (2020). Microbiological analysis of endodontically treated teeth with apical periodontitis before and after endodontic retreatment. *Clinical Oral Investigations*, online ahead of print. <https://doi.org/10.1007/s00784-020-03510-2>
- Barthel, C. R., Zimmer, S., Zilliges, S., Schiller, R., Göbel, U. B., & Roulet, J.-F. (2002). In situ antimicrobial effectiveness of chlorhexidine and calcium hydroxide: gel and paste versus gutta-percha points. *Journal of Endodontics*, *28*(6), 427–430. <https://doi.org/10.1097/00004770-200206000-00002>
- Carvalho, M. C., Zuolo, M. L., Arruda-Vasconcelos, R., Marinho, A. C. S., Louzada, L. M., Francisco, P. A., Pecorari, V. G. A., & Gomes, B. P. F. A. (2019). Effectiveness of XP-Endo Finisher in the reduction of bacterial load in oval-shaped root canals. *Brazilian Oral Research*, *33*(e021), 1–8. <https://doi.org/10.1590/1807-3107BOR-2019.VOL33.0021>
- Chávez De Paz, L. E. (2012). Development of a multispecies biofilm community by four root canal bacteria. *Journal of Endodontics*, *38*(3), 318–323. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2011.11.008>
- Chávez de Paz, L. E., Dahlén, G., Molander, A., Möller, Å., & Bergenholtz, G. (2003). Bacteria recovered from teeth with apical periodontitis after antimicrobial endodontic treatment. *International Endodontic Journal*, *36*(7), 500–508. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2591.2003.00686.x>
- Chávez de Paz, L. E., Davies, J. R., Bergenholtz, G., & Svensäter, G. (2015). Strains of *Enterococcus faecalis* differ in their ability to coexist in biofilms with other root canal bacteria. *International Endodontic Journal*, *48*(10), 916–925. <https://doi.org/10.1111/iej.12501>
- Cieplik, F., Zaura, E., Brandt, B. W., Buijs, M. J., Buchalla, W., & Crielaard, W. (2019). Microcosm biofilms cultured from different oral niches in periodontitis patients. *Journal of Oral Microbiology*, *11*(1), 1–20.

<https://doi.org/10.1080/20022727.2018.1551596>

- Faria-Júnior, N. B., Tanomaru-Filho, M., Berbert, F. L. C. V., & Guerreiro-Tanomaru, J. M. (2013). Antibiofilm activity, pH and solubility of endodontic sealers. *International Endodontic Journal*, 46(8), 755–762. <https://doi.org/10.1111/iej.12055>
- Gomes, B. P.F.A., Pinheiro, E. T., Gadê-Neto, C. R., Sousa, E. L. R., Ferraz, C. C. R., Zaia, A. A., Teixeira, F. B., & Souza-Filho, F. J. (2004). Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiology and Immunology*, 19(2), 71–76. <https://doi.org/10.1046/j.0902-0055.2003.00116.x>
- Gomes, B. P.F.A., Drucker, D. D., & Lilley, J. D. (1999). Endodontic microflora of different teeth in the same mouth. *Anaerobe*, 5, 241–245.
- Haapasalo, M., Shen, Y., Qian, W., & Gao, Y. (2010). Irrigation in endodontics. *Dental Clinics of North America*, 54(2), 291–312. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2009.12.001>
- Hsiao, W. W. L., Li, K. L., Liu, Z., Jones, C., Fraser-Liggett, C. M., & Fouad, A. F. (2012). Microbial transformation from normal oral microbiota to acute endodontic infections. *BMC Genomics*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-345>
- Keskin, C., Demiryürek, E. Ö., & Onuk, E. E. (2017). Pyrosequencing analysis of cryogenically ground samples from primary and secondary/persistent endodontic infections. *Journal of Endodontics*, 43(8), 1309–1316. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2017.03.019>
- Li, Y., Sun, K., Ye, G., Liang, Y., Pan, H., Wang, G., Zhao, Y., Pan, J., Zhang, J., & Fang, J. (2015). Evaluation of cold plasma treatment and safety in disinfecting 3-week root canal enterococcus faecalis biofilm in vitro. *Journal of Endodontics*, 41(8), 1325–1330. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2014.10.020>
- Moller, A. J. R., Fabricius, L., Dahlén, G., Öhman, A. E., & Heyden, G. (1981). Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. *European Journal of Oral Sciences*, 89(6), 475–484.
- Montagner, F., Gomes, B. P. F. A., & Kumar, P. S. (2010). Molecular fingerprinting reveals the presence of unique communities associated with paired samples of root canals and acute apical abscesses. *Journal of Endodontics*, 36(9), 1475–1479. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2010.06.004>
- Moraes, L. C., Lang, P. M., Arcanjo, R. A., Rampelotto, P. H., Fatturi-Parolo, C. C., Ferreira, M. B. C., & Montagner, F. (2020). Microbial ecology and predicted metabolic pathways in various oral environments from patients with acute endodontic infections. *International Endodontic Journal*, 53(12), 1603–1617. <https://doi.org/10.1111/iej.13389>
- Moraes, L. C., Só, M. V. R., Dal Pizzol, T. S., Ferreira, M. B. C., & Montagner, F. (2015). Distribution of genes related to antimicrobial resistance in different

- oral environments: a systematic review. *Journal of Endodontics*, 41(4), 434–441. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2014.12.018>
- Mosaddad, S. A., Tahmasebi, E., Yazdani, A., Rezvani, M. B., Seifalian, A., Yazdani, M., & Tebyanian, H. (2019). Oral microbial biofilms: an update. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 38(11), 2005–2019. <https://doi.org/10.1007/s10096-019-03641-9>
- Nair, P. N. R., Ramachandran Nair, P. N., & Nair, P. N. R. (1987). Light and electron microscopic studies of root canal flora and periapical lesions. *Journal of Endodontics*, 13(1), 29–39. [https://doi.org/10.1016/S0099-2399\(87\)80089-4](https://doi.org/10.1016/S0099-2399(87)80089-4)
- Neelakantan, P., Romero, M., Vera, J., Daood, U., Khan, A. U., Yan, A., & Cheung, G. S. P. (2017). Biofilms in endodontics—Current status and future directions. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(8), 1–21. <https://doi.org/10.3390/ijms18081748>
- Nyirabuhoro, P., Liu, M., Xiao, P., Liu, L., Yu, Z., Wang, L., & Yang, J. (2020). Seasonal variability of conditionally rare taxa in the water column bacterioplankton community of subtropical reservoirs in china. *Microbial Ecology*, 80(1), 14–26. <https://doi.org/10.1007/s00248-019-01458-9>
- Ozok, A. R., Persoon, I. F., Huse, S. M., Keijser, B. J. F., Wesselink, P. R., Crielaard, W., & Zaura, E. (2012). Ecology of the microbiome of the infected root canal system: a comparison between apical and coronal root segments. *International Endodontic Journal*, 45(6), 530–541. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2011.02006.x>
- Park, O. J., Jeong, M. H., Lee, E. H., Cho, M. R., Hwang, J., Cho, S., Yun, C. H., Han, S. H., & Kim, S. Y. (2020). A pilot study of chronological microbiota changes in a rat apical periodontitis model. *Microorganisms*, 8(8), 1–14. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8081174>
- Pedrós-Alió, C. (2012). The Rare Bacterial Biosphere. *Annual Review of Marine Science*, 4, 449–446. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-120710-100948>
- Peters, O. A., Bardsley, S., Fong, J., Pandher, G., & Divito, E. (2011). Disinfection of root canals with photon-initiated photoacoustic streaming. *Journal of Endodontics*, 37(7), 1008–1012. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2011.03.016>
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., & Glöckner, F. O. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, 41(D1), 590–596. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>
- Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C., & Mahé, F. (2016). VSEARCH: A versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ*, 2016(10), 1–22. <https://doi.org/10.7717/peerj.2584>
- Sánchez-Sanhueza, G., Bello-Toledo, H., González-Rocha, G., Gonçalves, A. T.,

- Valenzuela, V., & Gallardo-Escárate, C. (2018). Metagenomic study of bacterial microbiota in persistent endodontic infections using next-generation sequencing. *International Endodontic Journal*, *51*(12), 1336–1348. <https://doi.org/10.1111/iej.12953>
- Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., Hollister, E. B., Lesniewski, R. A., Oakley, B. B., Parks, D. H., Robinson, C. J., Sahl, J. W., Stres, B., Thallinger, G. G., Van Horn, D. J., & Weber, C. F. (2009). Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, *75*(23), 7537–7541. <https://doi.org/10.1128/AEM.01541-09>
- Shin, J. M., Luo, T., Lee, K. H., Guerreiro, D., Botero, T. M., McDonald, N. J., & Rickard, A. H. (2018). Deciphering endodontic microbial communities by next-generation sequencing. *Journal of Endodontics*, *44*(7), 1080–1087. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2018.04.003>
- Siqueira Jr, J. F., & Rôças, I. N. (2013). Microbiology and treatment of acute apical abscesses. *Clinical Microbiology Reviews*, *26*(2), 255–273. <https://doi.org/10.1128/CMR.00082-12>
- Siqueira Jr, J. F., & Rôças, I. N. (2005). Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 2 - Redefining the endodontic microbiota. *Journal of Endodontics*, *31*(7), 488–498. <https://doi.org/10.1097/01.don.0000157990.86638.49>
- Siqueira Jr, J. F., & Rôças, I. N. (2009a). Community as the unit of pathogenicity: An emerging concept as to the microbial pathogenesis of apical periodontitis. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*, *107*(6), 870–878. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2009.01.044>
- Siqueira Jr, J. F., & Rôças, I. N. (2009b). Distinctive features of the microbiota associated with different forms of apical periodontitis. *Journal of Oral Microbiology*, *1*(2009), 1–12. <https://doi.org/10.3402/jom.v1i0.2009>
- Siqueira Jr, J. F., Rôças, I. N., Favieri, A., & Lima, K. C. (2000). Chemomechanical reduction of the bacterial population in the root canal after instrumentation and irrigation with 1%, 2.5%, and 5.25% sodium hypochlorite. *Journal of Endodontics*, *26*(6), 331–334. <https://doi.org/10.1097/00004770-200006000-00006>
- Siqueira Jr, J. F., Rôças, I. N., & Lopes, H. P. (2002). Patterns of microbial colonization in primary root canal infections. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, *93*(2), 174–178. <https://doi.org/10.1067>
- Sundqvist, G. (1992). Associations between microbial species in dental root canal infections. *Oral Microbiology and Immunology*, *7*(5), 257–262. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.1992.tb00584.x>
- Swimberghe, R. C. D. D., Coenye, T., De Moor, R. J. G. G., & Meire, M. A. (2019). Biofilm model systems for root canal disinfection: a literature review.

International Endodontic Journal, 52(5), 604–628.
<https://doi.org/10.1111/iej.13050>

- Teves, A., Blanco, D., Casaretto, M., Torres, J., Alvarado, D., & Jaramillo, D. E. (2019). *Effectiveness of different disinfection techniques of the root canal in the elimination of a multi-species biofilm*. 11(11), 0–5.
<https://doi.org/10.4317/jced.56000>
- Tzanetakakis, G. N., Azcarate-Peril, M. A., Zachaki, S., Panopoulos, P., Kontakiotis, E. G., Madianos, P. N., & Divaris, K. (2015). Comparison of bacterial community composition of primary and persistent endodontic infections using pyrosequencing. *Journal of Endodontics*, 41(8), 1226–1233.
<https://doi.org/10.1016/j.joen.2015.03.010>
- Velsko, I. M., & Shaddox, L. M. (2018). Consistent and reproducible long-term in vitro growth of health and disease-associated oral subgingival biofilms. *BMC Microbiology*, 18(70), 1–14.
- Welch, J. L. M., Dewhirst, F. E., & Borisy, G. G. (2019). Biogeography of the Oral Microbiome: The Site-Specialist Hypothesis. *Annual Review of Microbiology*, Sep(73), 335–358. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090817-062503>.Biogeography
- Welch, J. L. M., Ramírez-Puebla, S. T., & Borisy, G. G. (2020). Oral microbiome geography: micron-scale habitat and niche. *Cell Host and Microbe*, 28(2), 160–168. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.07.009>
- Xu, X., He, J., Xue, J., Wang, Y., Li, K., Zhang, K., Guo, Q., Liu, X., Zhou, Y., Cheng, L., Li, M., Li, Y., Li, Y., Shi, W., & Zhou, X. (2015). Oral cavity contains distinct niches with dynamic microbial communities. *Environmental Microbiology*, 17(3), 699–710. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12502>
- Yang, Y., Shen, Y., Wang, Z., Huang, X., Maezono, H., Ma, J., Cao, Y., & Haapasalo, M. (2016). Evaluation of the susceptibility of multispecies biofilms in dentinal tubules to disinfecting solutions. *Journal of Endodontics*, 42(8), 1246–1250. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2016.05.011>
- Zehnder, M., Rechenberg, D.-K., Thurnheer, T., Lüthi-Schaller, H., & Belibasakis, G. N. (2017). FISHing for gutta-percha-adhered bio films in purulent post-treatment apical periodontitis. *Molecular Oral Microbiology*, 32(3), 226–235. <https://doi.org/10.1111/omi.12166>

Figure Captions

Figure 1. Schematic drawing of intraoral device. A) Right side; B) Left side; and C) Diagram illustrating NGS DNA extraction, 16S rRNA gene amplification, sequencing and bioinformatics.

Figure 2. Relative abundance of the 8 prevalent phyla (A), families (B) and genera (C) in samples.

Figure 3. Relative abundance of families.

Figure 4. Prevalence of OTUs in interquartile per phylum.

Figure 5. A) PCoA analysis based on Bray-Curtis dissimilarity; B) Alpha diversity analysis using Shannon index; C) Alpha diversity using Chao1 index.

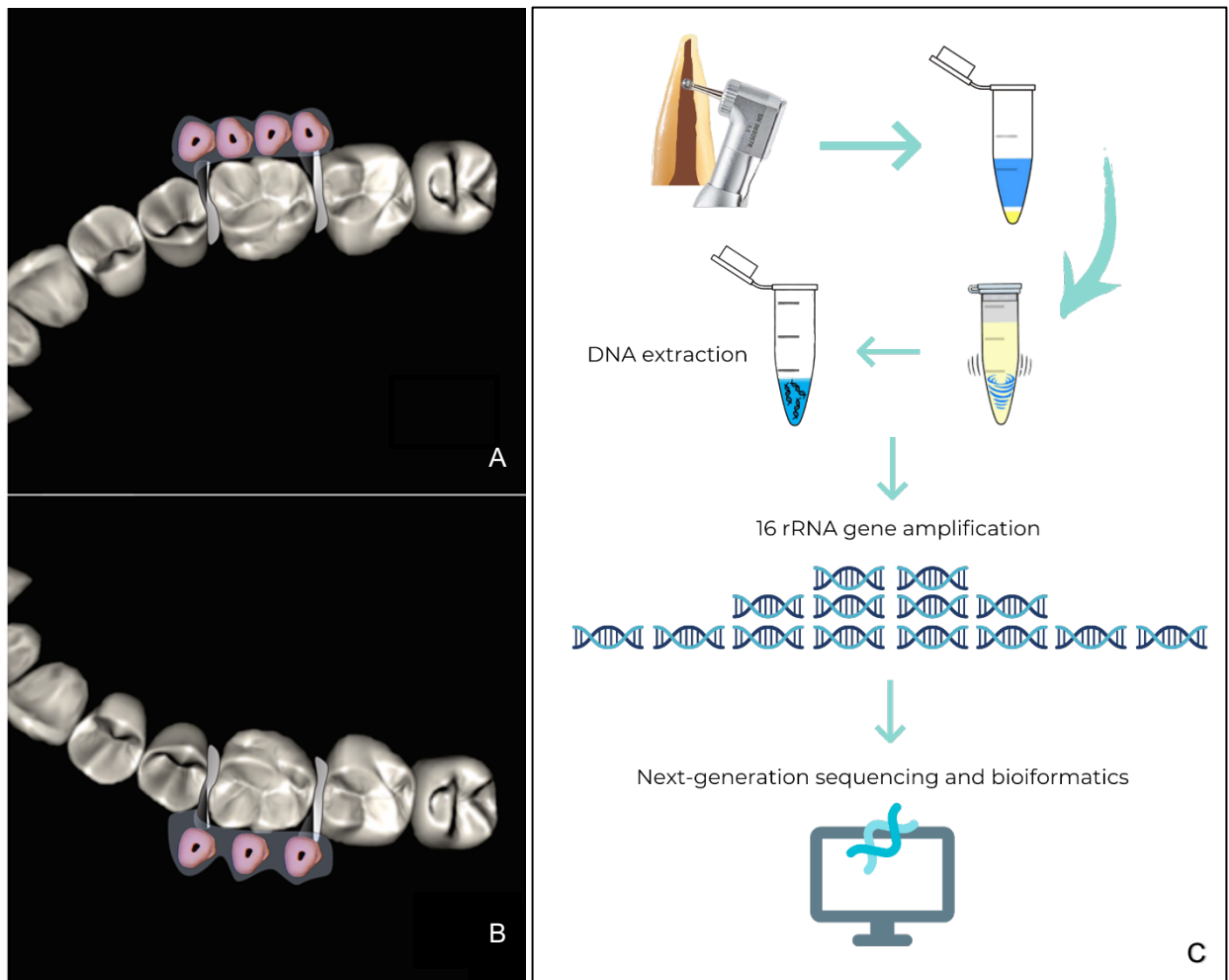


Figure 1. Schematic drawing of intraoral device. A) Right side; B) Left side; and C) Diagram illustrating NGS DNA extraction, 16S rRNA gene amplification, sequencing and bioinformatics.

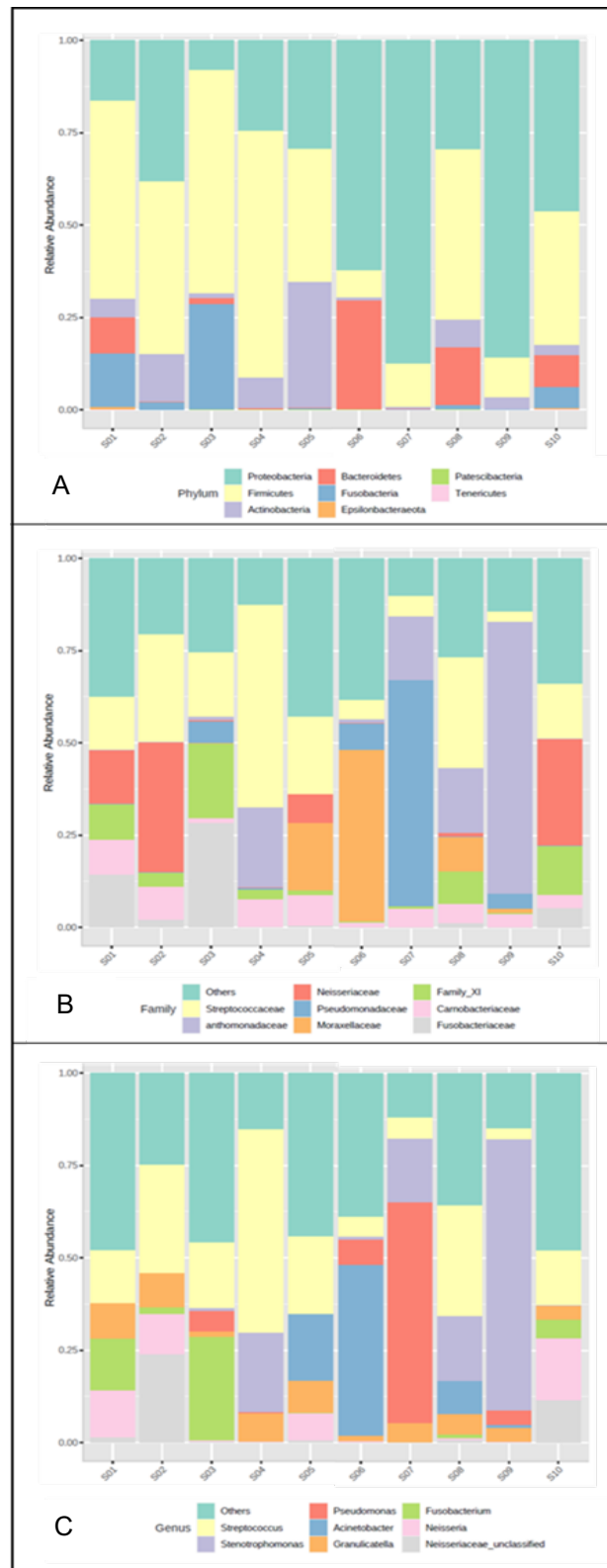


Figure 2. Relative abundance of the 8 prevalent phyla (A), families (B) and genera (C) in samples.

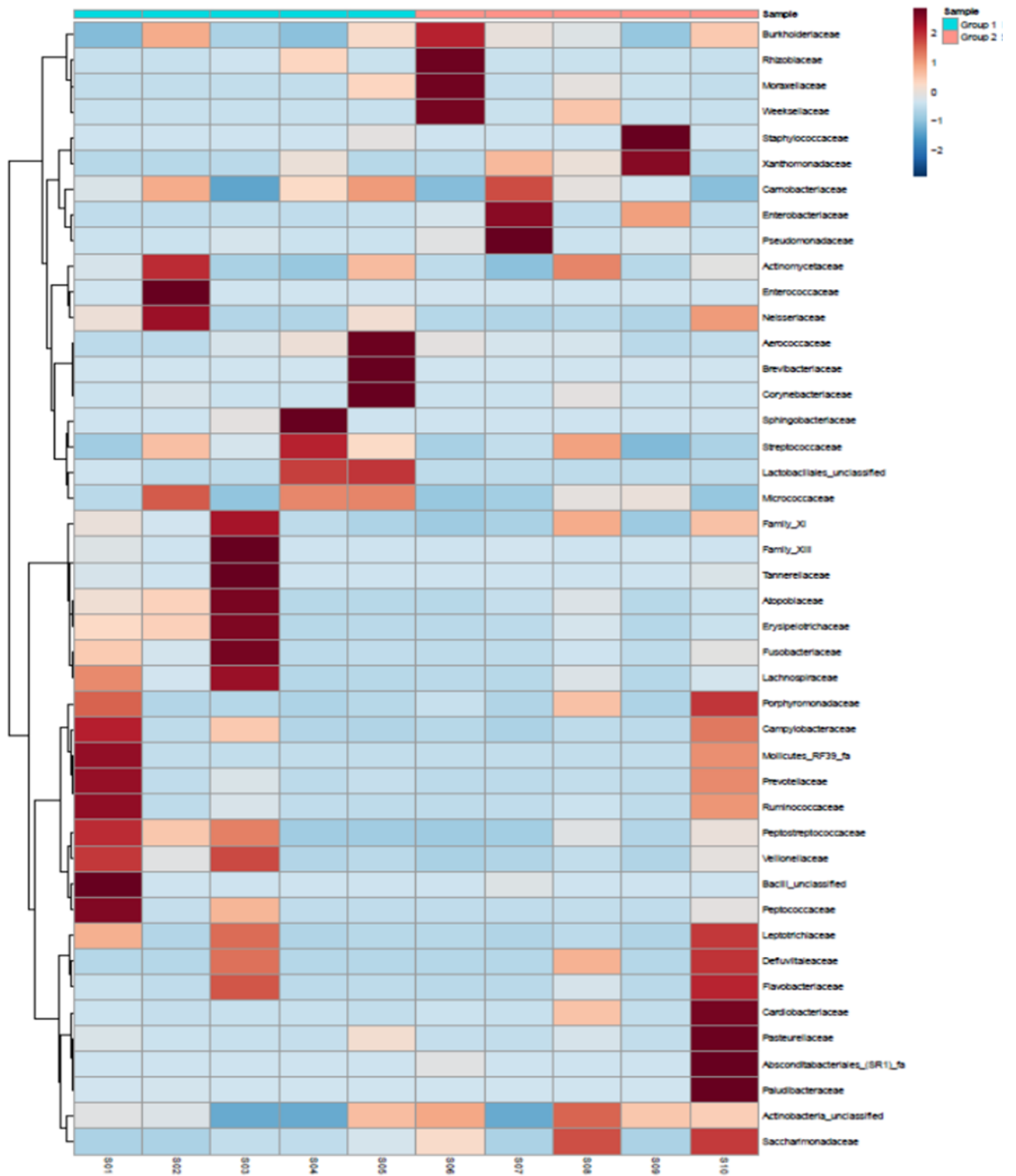


Figure 3. Relative abundance of families.

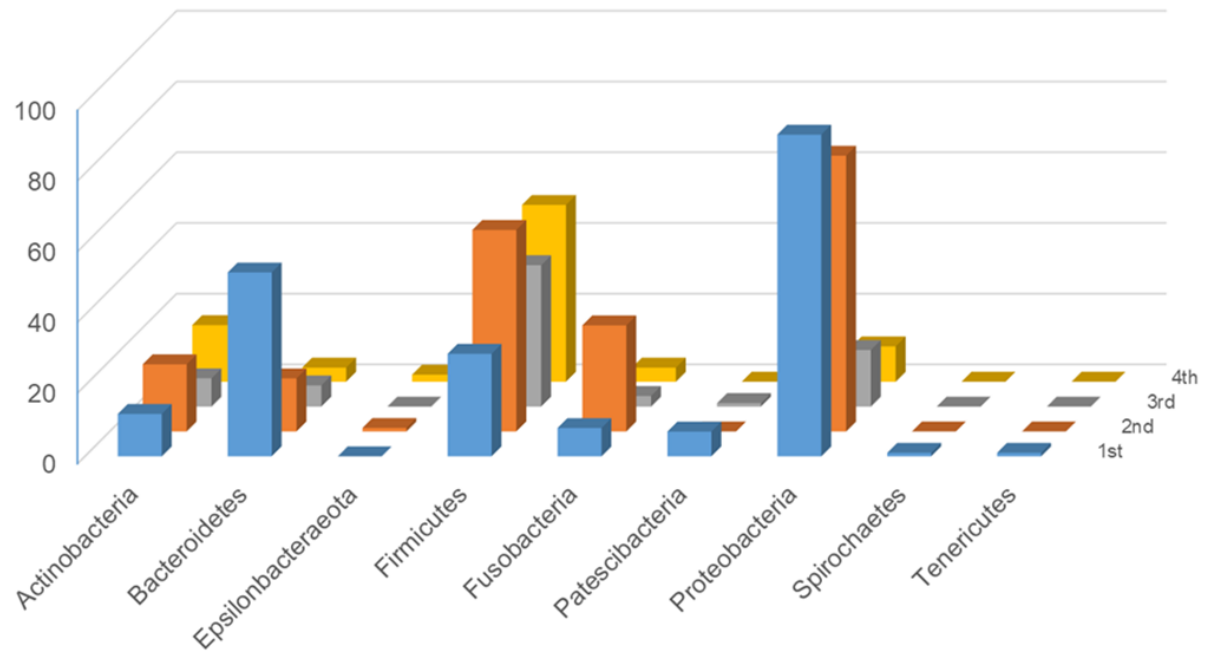


Figure 4. Prevalence of OTUs in interquartile per phylum.

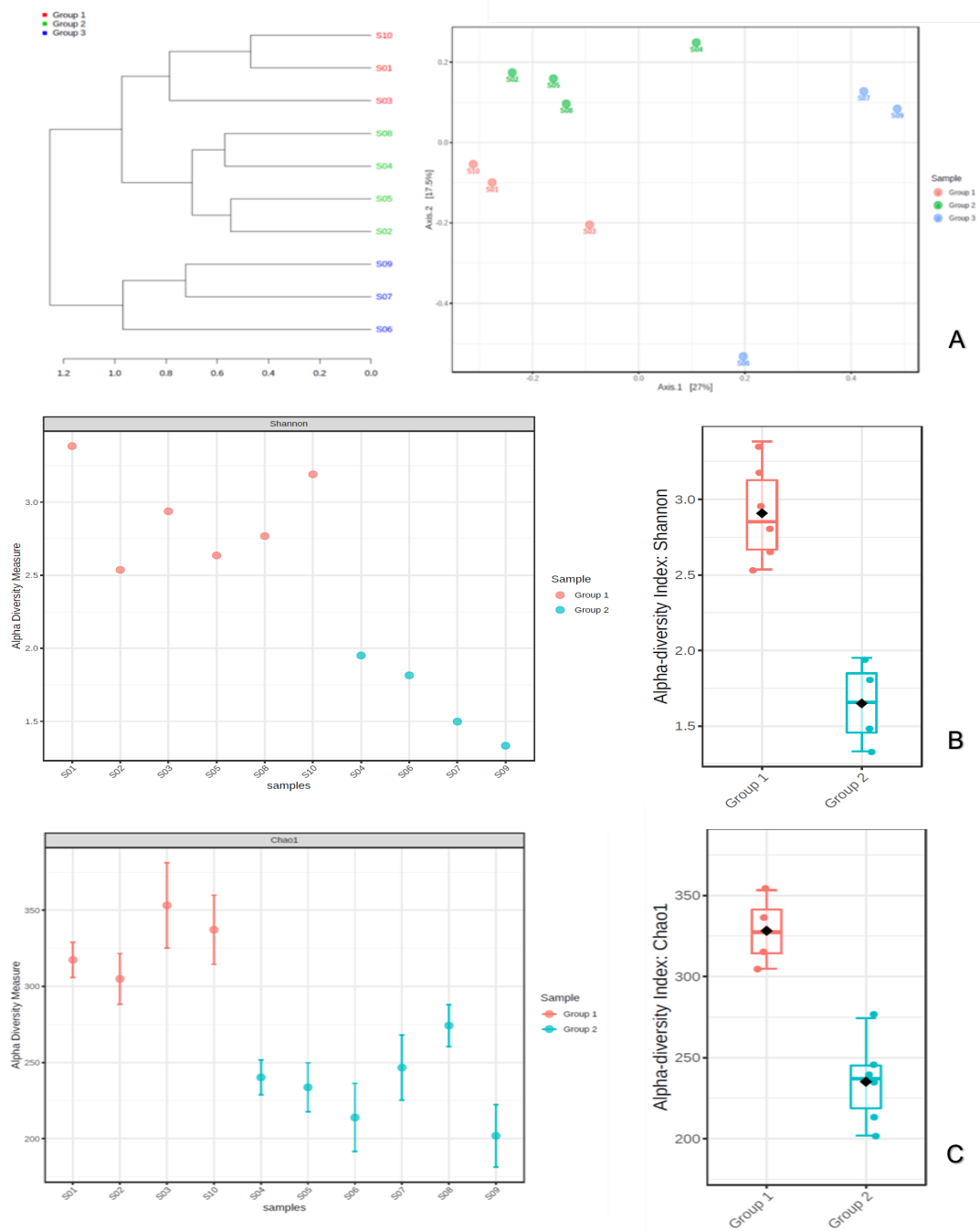


Figure 5. A) PCoA analysis based on Bray-Curtis dissimilarity; B) Alpha diversity analysis using Shannon index; C) Alpha diversity using Chao1 index.

Table 1 - Number of OTUs distribution in relation to the prevalence (%) in samples.

| Prevalence in samples (%) | Number of OTUs |
|----------------------------------|-----------------------|
| 100 | 38 |
| 90 | 21 |
| 80 | 27 |
| 70 | 32 |
| 60 | 42 |
| 50 | 64 |
| 40 | 45 |
| 30 | 91 |
| 20 | 100 |
| 10 | 102 |

Table 2 – Prevalence (%) and abundance (%) of genus always abundant taxa (>1%) in samples.

| Genus | Phylum | Prevalence (%) | Abundance (%) |
|--|-----------------------|-----------------------|----------------------|
| <i>Acinetobacter</i> | <i>Proteobacteria</i> | 100 | 6.4 |
| <i>Chryseobacterium</i> | <i>Bacteroidetes</i> | 30 | 2.9 |
| <i>Corynebacteriaceae_unclassified</i> | <i>Actinobacteria</i> | 50 | 1.1 |
| <i>Empedobacter</i> | <i>Bacteroidetes</i> | 30 | 1.3 |
| <i>Enterobacteriaceae_unclassified</i> | <i>Proteobacteria</i> | 100 | 1.9 |
| <i>Fusobacterium</i> | <i>Fusobacteria</i> | 100 | 5.0 |
| <i>Gemella</i> | <i>Firmicutes</i> | 100 | 2.8 |
| <i>Granulicatella</i> | <i>Firmicutes</i> | 100 | 5.5 |
| <i>Neisseria</i> | <i>Proteobacteria</i> | 100 | 4.5 |
| <i>Neisseriaceae_unclassified</i> | <i>Proteobacteria</i> | 100 | 3.7 |
| <i>Parvimonas</i> | <i>Firmicutes</i> | 100 | 2.9 |
| <i>Pseudomonas</i> | <i>Proteobacteria</i> | 90 | 10.4 |
| <i>Rothia</i> | <i>Actinobacteria</i> | 100 | 3.6 |
| <i>Stenotrophomonas</i> | <i>Proteobacteria</i> | 90 | 12.8 |
| <i>Streptococcus</i> | <i>Firmicutes</i> | 100 | 19.4 |
| <i>Veillonella</i> | <i>Firmicutes</i> | 100 | 2.0 |

Table S1. Number of OTUs in each genus within each phylum per sample (n) and frequency of abundant species (>1% of OTUs) in each sample (S).

| Phylum | Genus | n01 | S01 | n02 | S02 | n03 | S03 | n04 | S04 | n05 | S05 | n06 | S06 | n07 | S07 | n08 | S08 | n09 | S09 | n10 | S10 |
|---------------------------|------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| <i>Actinobacteria</i> | <i>Actinobacteria_un</i> | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| | <i>Actinomyces</i> | 6 | 3 | 8 | 3 | 6 | 3 | 4 | 1 | 6 | 1 | 5 | 3 | 3 | 3 | 7 | 3 | 3 | 3 | 8 | 4 |
| | <i>Actinomycetaceae_un</i> | 2 | 0 | 2 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| | <i>Atopobium</i> | 1 | 0 | 1 | 0 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| | <i>Brevibacterium</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| | <i>Corynebacteriaceae_un</i> | 1 | 0 | 5 | 2 | 0 | 0 | 1 | 0 | 5 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| | <i>Corynebacterium</i> | 2 | 0 | 2 | 0 | 2 | 0 | 1 | 0 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 1 | 1 | 2 | 0 |
| | <i>Corynebacterium_1</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| | <i>F0332</i> | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | <i>Olsenella</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | <i>Rothia</i> | 20 | 5 | 16 | 2 | 11 | 4 | 22 | 4 | 17 | 3 | 10 | 4 | 13 | 3 | 17 | 3 | 18 | 3 | 18 | 4 |
| <i>Bacteroidetes</i> | <i>Alloprevotella</i> | 3 | 1 | 2 | 2 | 1 | 1 | 1 | 0 | 2 | 2 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 4 | 1 |
| | <i>Bergeyella</i> | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 4 | 1 |
| | <i>Capnocytophaga</i> | 5 | 0 | 3 | 1 | 4 | 1 | 3 | 2 | 3 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 0 | 6 | 3 |
| | <i>Chryseobacterium</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 20 | 5 | 20 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| | <i>Empedobacter</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 17 | 5 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| | <i>F0058</i> | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| | <i>Flavobacteriaceae_un</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| | <i>Myroides</i> | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | <i>Porphyromonas</i> | 4 | 1 | 2 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 2 | 1 | 0 | 0 | 3 | 3 |
| | <i>Prevotella</i> | 6 | 3 | 3 | 3 | 5 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 2 | 0 | 1 | 1 | 6 | 1 |
| | <i>Prevotella_2</i> | 3 | 1 | 0 | 0 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 3 | 1 |
| | <i>Prevotella_6</i> | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| | <i>Prevotella_7</i> | 3 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 2 | 0 |
| | <i>Prevotellaceae_un</i> | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| | <i>Sphingobacterium</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Tannerella</i> | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | |
| <i>Epsilonbacteraeota</i> | <i>Campylobacter</i> | 3 | 3 | 2 | 2 | 3 | 3 | 2 | 2 | 1 | 1 | 3 | 3 | 0 | 0 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| <i>Firmicutes</i> | <i>Abiotrophia</i> | 1 | 0 | 1 | 0 | 3 | 0 | 2 | 1 | 3 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------------------------------|----|---|----|---|----|---|----|---|----|---|----|---|----|---|----|---|----|---|----|
| <i>Bacilli_un</i> | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Catonella</i> | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| <i>Centipeda</i> | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| <i>Defluviitaleaceae_UCG-011</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| <i>Dialister</i> | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| <i>Enterococcaceae_un</i> | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Erysipelotrichaceae_UCG-006</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Family_XIII_ge</i> | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| <i>Family_XIII_UCG-001</i> | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| <i>Filifactor</i> | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| <i>Finegoldia</i> | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| <i>Gemella</i> | 7 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | 7 | 1 | 3 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | 7 | 1 | 1 | 1 | 7 |
| <i>Granulicatella</i> | 15 | 1 | 12 | 1 | 8 | 1 | 13 | 1 | 13 | 1 | 6 | 1 | 14 | 1 | 13 | 1 | 11 | 1 | 9 |
| <i>Johnsonella</i> | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| <i>Lachnoanaerobaculum</i> | 2 | 1 | 2 | 0 | 2 | 0 | 2 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| <i>Lachnospiraceae_un</i> | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| <i>Lactobacillales_un</i> | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Mogibacterium</i> | 3 | 0 | 1 | 0 | 3 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 2 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| <i>Oribacterium</i> | 4 | 2 | 3 | 0 | 4 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 2 | 0 | 2 | 0 | 3 | 0 | 1 | 0 | 2 |
| <i>Parvimonas</i> | 10 | 2 | 10 | 1 | 8 | 1 | 3 | 0 | 3 | 0 | 4 | 1 | 2 | 1 | 7 | 1 | 2 | 0 | 6 |
| <i>Peptoanaerobacter</i> | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| <i>Peptococcus</i> | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| <i>Peptostreptococcaceae_ge</i> | 5 | 1 | 5 | 0 | 3 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 4 |
| <i>Peptostreptococcus</i> | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| <i>Ruminococcaceae_UCG-014</i> | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| <i>Selenomonas</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| <i>Selenomonas_3</i> | 2 | 0 | 1 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| <i>Shuttleworthia</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Solobacterium</i> | 2 | 1 | 2 | 0 | 2 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| <i>Staphylococcus</i> | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 4 | 1 | 1 |
| <i>Stomatobaculum</i> | 2 | 1 | 1 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| <i>Streptococcus</i> | 60 | 2 | 61 | 2 | 49 | 2 | 67 | 2 | 53 | 2 | 34 | 3 | 40 | 3 | 58 | 3 | 21 | 3 | 46 |
| <i>Veillonella</i> | 16 | 2 | 13 | 1 | 15 | 1 | 6 | 0 | 3 | 0 | 3 | 0 | 2 | 0 | 8 | 0 | 5 | 0 | 11 |

4 MANUSCRITO 2: Versão em Inglês

O artigo a seguir intitula-se “Effect of different disinfection protocols in bacterial viability of an intraradicular multispecies biofilm formed *in situ*”, formatado segundo as normas específicas da revista Journal of Endodontics (fator de impacto 3.118, Qualis A1, Área de Odontologia, CAPES) a qual será submetido.

Matoso FB, Montager F, Jardine AP, Quintana RM, Grecca FS, Kopper PMP



June, 2021

Kenneth M. Hargreaves
Editor-in-Chief of Journal of Endodontics

Dear Editor,

Please find enclosed the manuscript entitled “**Effect of different disinfection protocols in bacterial viability of an intraradicular multispecies biofilm formed *in situ***” by Felipe Barros Matoso, Francisco Montagner, Alexander Pompermayer Jardine, Ramiro Martins Quintana, Fabiana Soares Grecca and myself for your consideration to publication in the Journal of Endodontics.

In consideration of the editors of the Journal of Endodontics taking action in reviewing and editing this submission, the author(s) undersigned hereby transfer, assign or otherwise convey all copyright ownership to the Elsevier in the event that such work is published in that Journal.

We affirm that we have no financial affiliation (e.g., employment, direct payment, stock holdings, retainers, consultant ships, patent licensing arrangements or honoraria), or involvement with any commercial organization with direct financial interest in the subject or materials discussed in this manuscript, nor have any such arrangements existed in the past three years. Any other potential conflict of interest is disclosed.

Sincerely,

Patricia Maria Poli Kopper

Effect of different disinfection protocols in bacterial viability of an intraradicular multispecies biofilm formed *in situ*

Felipe Barros Matoso^a, Francisco Montagner^{a,b}, Alexander Pompermayer Jardine^a, Ramiro Martins Quintana^a, Fabiana Soares Grecca^{a,b}, Patricia Maria Poli Kopper^{a,b}

a Programa de Pós-graduação em Odontologia, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

b School of Dentistry, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil.

Correspondence to:

Patricia Maria Poli Kopper

School of Dentistry, Federal University of Rio Grande do Sul.

Rua Ramiro Barcelos, 2492. Porto Alegre, Brazil.

E-mail address: patricia.kopper@ufrgs.br

Phone: +55 (51) 3308 5191

Authors' contact information:

Felipe Barros Matoso – prof.felipebarrosmatoso@gmail.com

Francisco Montagner – francisco.montagner@ufrgs.br

Alexander Pompermayer Jardine – alexanderpjardine@gmail.com

Ramiro Marins Quintana – ramiro_martins@hotmail.com

Fabiana Soares Grecca - fabiana.grecca@ufrgs.br

Patrícia Maria Poli Kopper - patricia.kopper@ufrgs.br

Authorship:

Felipe Barros Matoso – Main researcher. Helped carry out the experiment, analyzed and interpreted the data, drafted the article, and approved the final version.

Francisco Montagner - Contributed to the conception and design of the manuscript and revised and approved the final version.

Alexander Pompermayer Jardine - Helped carry out the experiment and analyzed the data.

Ramiro Marins Quintana - Helped carry out the experiment and analyzed the data.

Fabiana Soares Grecca - Contributed to the conception and design of the manuscript and revised and approved the final version.

Patrícia Maria Poli Kopper - Study supervisor. Contributed to the conception and design of the manuscript, analyzed and interpreted the data, and revised and approved the final version

Acknowledgments

The authors deny any conflict of interest.

Statement of Clinical Relevance

The effect of different disinfection protocols on an intraradicular multispecies biofilm formed *in situ* were evaluated. EC, PUI and aPDT had significant cell viability effects on the biofilm suggesting future studies to explain how large this effect has to be to reduce biofilm pathogenicity.

Effect of different disinfection protocols in bacterial viability of an intraradicular multispecies biofilm formed *in situ*

ABSTRACT

Introduction: To evaluate bacterial viability after the use of different disinfection protocols in root canals infected with a multispecies biofilm formed *in situ*. **Methods:** Palatal roots of maxillary molars with a single canal were contaminated by a multispecies biofilm in an intraoral device worn by 10 volunteers for 21 days. One root from each volunteer was assigned to one of each group (n=10): PUI, passive ultrasound irrigation; EC, Easy Clean; XPF, XP-endo Finisher; aPDT, antimicrobial photodynamic therapy; CI, conventional irrigation; and NC, negative control. The samples were evaluated under confocal laser scanning microscopy. The percentage of viable cells was calculated over the total percentage of biofilm biovolume using the BioImage L software. Kruskal-Wallis, Friedman and Dunn post-hoc tests compared obtained data ($\alpha=5\%$). **Results:** Disinfection protocols were not different from each other ($P>.05$). EC, PUI and aPDT had a lower cell viability than NC ($P<.05$). In the coronal third, EC, XPF, PUI and aPDT reduced the percentage of viable cells more than the NC ($P<.05$). EC had lower percentage of cell viable at coronal and middle thirds than at the apical ($P<.05$). **Conclusions:** EC, PUI e aPDT had significant effects on the cell viability of intraradicular multispecies biofilm formed *in situ*, when compared to samples without treatment. Clinical studies should investigate the role of the reduction of viable bacterial loads in the root canal system for the success of endodontic treatment.

Keywords: Biofilms, Endodontics, Root Canal Therapy, Root Canal Preparations, Confocal Microscopy, Photodynamic Therapy

Introduction

Microorganisms, organized in the root canal system as a biofilm, may remain viable even under adverse conditions for their growth (1). Biofilms hold nutrients and enable metabolic cooperation between various bacteria of the same or different species (2). Therefore, bacteria that are resistant to cleaning and shaping may be responsible for endodontic failures (3). Thus, different disinfection protocols have been investigated as alternative to reduce bacterial viability and improve root canal cleaning after preparation. Passive ultrasonic irrigation (PUI), automated instruments for irrigant agitation and antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) have been recommended after conventional needle irrigation (CI) as supplementary protocols for canal disinfection (4–7).

PUI has significantly reduced microbes in the root canal in *in vitro* trials (4,8,9). However, despite some promising results of its effect on infection reduction, a systematic review found no evidence of a significant effect on the improvement of root canal disinfection and, consequently, of periapical healing (10). XP-endo Finisher (XPF; FKG, La Chaux-de-Fonds, Switzerland) and Easy Clean (EC; Easy, Belo Horizonte, Brazil) are engine-driven files that have been developed for the agitation of irrigants after root canal cleaning and shaping, as alternatives to the use of PUI. However, reports of their effect on root canal disinfection are contradictory (4,6,7,9,11,12).

Laser applications have also been studied as adjunctive antimicrobial therapies for root canal disinfection, and studies suggest that they should be used as a supplementary antimicrobial therapy after endodontic debridement (13–15). Antimicrobial photodynamic therapy uses light of a specific wavelength to activate a nontoxic photoactive dye, called a photosensitizer, and generate highly reactive oxygen, which binds to microbial cell membranes and destroys them (16).

There is a considerable number of studies about different procedures to disinfect root canals (4,6,7-9,11-15). However, the effect of supplementary disinfection protocols on intraradicular multispecies biofilms in experimental conditions that aimed to simulate root canals with pulp necrosis has not been definitely established in the literature. This study used confocal laser scanning microscopy (CLSM) to analyze the effect of PUI, EC, XPF, aPDT and CI after cleaning and shaping on the cell viability of a multispecies biofilm formed *in situ*. The null hypothesis was that the different

disinfection protocols do not affect the cell viability of intraradicular multispecies biofilms formed *in situ*.

Materials and Methods

Ethical considerations

This study was approved by the Ethics in Research Committee of the Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil (CAAE: 01688918.8.0000.5347) and registered on SISGEN (Protocol A09C4B7).

Sample preparation

Sixty-two extracted maxillary molars with closed apex and without internal resorption or endodontic treatment were stored in 0.001% NaOCl at 4° C until use. Palatal roots were sectioned close to the cemento-enamel junction to prepare standard 17-mm-long samples. Roots were included if a #20 K-file (Sirona Dentsply, York, PA, USA) could be run along all the canal and be juxtaposed to the canal walls.

First, a #10 K-file (Sirona Dentsply, York, PA, USA) was used for canal exploration. Working length (WL) was set at 1 mm short of the apical foramen. To standardize canal diameter, the ProDesign Logic 25.01 (Easy, Belo Horizonte, MG, Brazil) file was used for the glide path, and then the ProDesign Logic 25.06 (Easy, Belo Horizonte, MG, Brazil) shaped the canal. The instruments were used in a rotary movement using a VDW Silver system (VDW GmbH, Munich, Germany) and the DR's choice program for individual speed and torque settings. Torque was 100 g.cm² at 350 rpm for the 25.01 file and 400 g.cm² at 950 rpm for the 25.06 file. Before and after each instrument, the canals were irrigated with 2 mL of distilled water using a disposable plastic syringe (Ultradent Products Inc., South Jordan, UT, USA). An aspiration cannula and a silicone capillary tip (Ultradent Products Inc., South Jordan, UT, USA) were used for aspiration during irrigation.

After initial preparation, the roots were sectioned (Lab-Cut Model 1010, EXTEC, Enfield, CT, USA) into two halves longitudinally. The internal surface of each half was polished using 120-, 280- and 400-grit wet sandpaper strips (Norton, Guarulhos, SP, Brazil). After that, the samples were rinsed in a ultrasonic bath using 20 mL of detergent (Tween® 80, SIGMA, Saint Louis, MO, USA) for 3 cycles of five minutes

each, with detergent replacement after each cycle. Then, a cycle of five minutes with 10 mL of EDTA (Biodinâmica, Ibiporã, PR, Brazil) was performed. The samples were autoclaved for 30 min at 121°C and 1 atm and then individually immersed in Falcon tubes (MyLabor, São Paulo, SP, Brazil) containing 5 mL of distilled water. Two roots selected randomly to control sterility were kept in Brain-Heart Infusion Broth (BHI) (KASVI, Curitiba, PR, Brazil) for 24 h at 37° C. There was no turbidity in the culture medium after that time.

Intraradicular multispecies biofilm formed in situ

Ten volunteers of both genders aged 21 to 35 years wore intraoral devices. Volunteers had no caries, gingivitis, periodontal or systemic diseases, were not using orthodontic devices or undergoing tooth bleaching, were not smokers and had not undergone any antimicrobial treatment in the last two months before and during the device use.

To fabricate the intraoral prosthetic devices the methodology described by Barthel et al. 2002 (17) was adapted. Briefly, impressions of the maxillary arch of the volunteers were taken. Two devices for each volunteer with lateral slots for the placement of the roots were fabricated using transparent self-curing acrylic resin (Jet, Artigos Odontológicos Clássico, São Paulo, SP, Brazil). The two halves of the roots were juxtaposed and fastened to the device using a piece of orthodontic wire and utility wax. Six roots were assigned to each volunteer, divided into two intraoral devices with three roots each, one for the right and the other for the left side, and kept in the mouth simultaneously. The apical portion of the canal was sealed with wax, and the coronal part was left open so that the canal lumen was exposed to the oral environment. The devices were worn for 21 days to enable biofilm formation and growth (17). During this time, they were removed from the mouth and stored in humid gauze only for eating and oral hygiene.

Twenty-one days later, immediately after removing the device from the participant's mouth, the roots were separated from the devices and randomly divided into 5 experimental groups: PUI, EC, XPF, aPDT, CI and a negative control group (NC) (n=10). The roots were individually stored in Falcon tubes containing reduced transport fluid until the moment of root canal cleaning and shaping.

Experimental design

Few moments after the remove of teeth from the device, the root canal of all samples, except in the negative control group (no treatment), were prepared, by a single trained operator, using the ProDesign Logic 40.05 (400 gcm² and 950 rpm; Easy, Belo Horizonte, MG, Brazil) file to the WL. Before and after the use of the file, the canals were irrigated with 2 mL of 2.5% NaOCl (Asfer, São Caetano do Sul, SP, Brazil) using a syringe (Ultradent, South Jordan, UT, USA) and needle (NaviTip 30; Ultradent, South Jordan, UT, USA) calibrated to 2 mm short of WL, and simultaneously aspirated using a capillary tip (Ultradent, South Jordan, UT, USA).

After that, the protocols for final cleaning were applied (Table 1). In all groups, total irrigant volume was 6 mL of 2.5% NaOCl at 37°C, 5 mL of 17% EDTA and 3 mL of distilled water. Irrigation and aspiration were simultaneous. The canals were kept full of NaOCl during the use of the files in the PUI, EC and XPF groups. In the aPDT group, the canals were irrigated with 6 mL of 2.5% NaOCl, 5 mL of 17% EDTA and 1.5 mL of distilled water. They were then dried and filled with 1 mL of 0.005% methylene blue for 2 minutes. The optical fiber was then inserted in the canal and the Laser Duo unit was activated for 180s. The canals were then irrigated with 1.5 mL of distilled water. Before laser use, output power was checked using the Laser Check (MM Optics) power meter.

Evaluation using CLSM

Immediately after disinfection protocols, the two halves of the roots were separated and analyzed at CLSM. Five minutes before being taken to the Olympus Fluoview 1000 (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) microscope, the samples were stained with 10 µL of a 1:1 SYTO 9 and propidium iodide solution (L-13152 Live/Dead BacLight Bacterial Viability kit; Life Technologies, Carlsbad, CA) (18). The half that better showed the biofilm of each sample was chosen for analyses and three image sets, one from each third of the canal, with a stack depth of 2µm and at a resolution of 512 x 512 pixels, were captured at a 60x magnification oil immersion lens using two lasers at 473nm and 559nm of wavelength. After image acquisitions using the LUT tool of the Olympus Fluoview Ver.4.2b Viewer, the background, which corresponded to the stained dentin, was removed.

After that, cell biovolume was measured using the BioImage_L software (The MathWorks, Natick, MA) (19). The surface and volume distribution tool were used to check the biovolume of viable (green) and nonviable cells (red) in each third of each sample after excluding the first stack, which corresponded to the canal surface, and standardizing depth for the next four stacks (8 μm). Noise reduction was adjusted to 0.01 to minimize background staining. The percentage of viable cell biovolume to total cell biovolume was then calculated, and the result was used for comparisons.

The Kolmogorov-Smirnov test did not confirm data normality. Therefore, the percentage of viable cells along all the root canal and in each of its thirds was compared between groups using the Kruskal-Wallis test. The Friedman test was used to compare cell viability in the different thirds of canals in each group. The Dunn post-hoc test was used. The significance level was set at 5%, and data were analyzed using the GraphPad Prisma 7.04 (GraphPad Software, San Diego, CA) software.

Results

The percentages of viable cell biovolume are summarized in Table 2 and viable and nonviable cells distribution illustrated in Figure 1. The effect of disinfection protocols in all root canal thirds were not different among the test groups ($P > .05$). EC, PUI and aPDT samples had a lower cell viability than control ($P < .05$). XPF and CI values were similar to those of the control group ($P > .05$). In the coronal third, EC, XPF, PUI and aPDT percentage of viable cell biovolume was lower than in the control group ($P < .05$). In the middle and apical thirds, the percentage of viable cells was similar in all groups ($P > .5$). In the EC group, the percentage of viable cell biovolume in the coronal and middle thirds was lower than in the apical third ($P < .05$).

Discussion

This study provides information about the effect of different protocols to disinfect root canals on the cell viability of intraradicular biofilm formed *in situ*. The null hypothesis was rejected, as the biovolume of viable cells was smaller in the EC, PUI and aPDT groups than in the control group ($P < .05$). Despite other studies also found a reduction in root canal infection when using supplementary disinfection protocols after canal cleaning and shaping (4,6,9,11,14,15), to the best of our knowledge, this is

the first report regarding the effect of complementary protocols on intraradicular multispecies biofilm formed *in situ*.

The experimental model used in this study was selected to simulate clinical conditions. It tested the effect of different protocols on multispecies biofilms formed *in situ*, which are more resistant to disinfection (20). The negative control samples confirmed the presence of biofilm in the root canals after volunteers had used the devices, as demonstrated by previous investigations with *in situ* biofilms (17,21,22). The monospecies biofilm, such as for *Enterococcus faecalis*, is commonly used to evaluate antimicrobial effect of different protocols (23–25). However, it simplifies ecological conditions and it does not reproduce the clinical scenario of endodontic infections (26).

In this study, there were no differences between the tested disinfection protocols. However, EC, PUI and aPDT significantly affected the biofilm cell viability when compared to the control group. The samples in those groups had a lower percentage of viable cells than samples without treatment. As herein, previous investigations also found a positive effect of EC in the reduction of root canal infection using different methodological models (6,7,12). Our results showed that even in a multispecies biofilm formed *in situ* this automated instrument for irrigant agitation significantly reduced the biovolume of viable cell compared to samples without treatment.

According to previous studies, PUI demonstrated to significantly interfere with the microbial component of the root canal system, when compared to the control group (4,6–9,12). However, PUI's efficacy in reducing microbial loads in samples collected from teeth with a primary infection seems to be greater than that found for EC (6). Some methodological differences may explain these contradictory results. Unlike investigations that collected samples from the root main canal, this study measured the proportion of viable cells inside dentinal tubules.

In agreement with our findings, the reduction of microbial loads due to the use of aPDT was confirmed by previous analysis with CFUs counting, in *in vitro* multispecies biofilms (13,15). An increase of the number of nonviable cells when aPDT is employed, as previously observed in a study using *E. faecalis* biofilm (5), could be expected due to its deleterious effect on the cell membrane of microorganisms (16). The comparison of aPDT samples with those in the control group corroborates with

this expectation as the intervention reduced the percentage of the biofilm viable cell biovolume.

The effect of XPF on the reduction of viable cell biovolume in the biofilm along all the root canal was not significant when compared with the control group. These results do not agree with those studies that found a reduction in microbial load in root canals after the use of XPF (4,8,9,11). These contradictory findings may be assigned to methodological differences, such as the characteristics of the biofilm under analysis. Differently from some studies (4,9,11), we kept 2.5% NaOCl at 37° C before use to ensure that XPF worked perfectly while in the austenite phase. Other studies (8,11) also increased NaOCl temperature to simulate clinical conditions.

Previous studies have investigated CI with sodium hypochlorite using a syringe and needle and found positive antimicrobial activity and dissolution of organic matter, both pulp tissue or biofilm (27,28). These results, however, were associated with several factors, such as needle characteristics, reach of irrigation inside the canal, irrigant volume and anatomic complexity of the root canals (29,30). In our study, the comparison with the control samples revealed that CI did not reduce the biovolume of viable cells, and its effect was similar to that of XPF. Similarly, CI had no effect on the bacterial load in previous investigations (4,6–9,12).

CLSM assessed the effect of different protocols to remove multispecies biofilms formed *in situ* in root canals by enabling counting the number of viable and nonviable bacteria in a three-dimensional structure of the biofilm adhered to the dentin wall (19,20,24). This experimental model revealed that disinfection protocols for the root canal system promote different levels of ecological effects on multispecies biofilms formed *in situ*. However, this model does not explain how large this effect has to be to reduce biofilm pathogenicity, which should be investigated in future studies.

In this study, EC, PUI and aPDT had significant ecological effects on intraradicular multispecies biofilms formed *in situ*, as they reduced the biovolume of viable bacterial cells when compared with samples without treatment. Clinical studies should investigate the role of the reduction of viable bacterial loads in the root canal system for the success of endodontic treatment.

References

- 1 Santos A L, Siqueira Jr J F, Rôças I N, Jesus E C, Rosado A S, Tiedje J M. Comparing the bacterial diversity of acute and chronic dental root canal infections. *PLoS One* 2011;6(11):14–21. Doi: 10.1371/journal.pone.0028088.
- 2 Neelakantan P, Romero M, Vera J, et al. Biofilms in Endodontics—Current status and future directions. *Int J Mol Sci* 2017;18(8):1–21. Doi: 10.3390/ijms18081748.
- 3 Haapasalo M, Shen Y, Wang Z, Gao Y. Irrigation in endodontics. *Br Dent J* 2014;216(6):299–303. Doi: 10.1038/sj.bdj.2014.204.
- 4 Bao P, Shen Y, Lin J, Haapasalo M. In Vitro Efficacy of XP-endo Finisher with 2 Different Protocols on Biofilm Removal from Apical Root Canals. *J Endod* 2017;43(2):321–5. Doi: 10.1016/j.joen.2016.09.021.
- 5 López-Jiménez L., Fusté E., Martínez-Garriga B., Arnabat-Domínguez J., Vinuesa T., Viñas M. Effects of photodynamic therapy on *Enterococcus faecalis* biofilms. *Lasers Med Sci* 2015;30:1519–26. Doi: 10.1007/s10103-015-1749-y.
- 6 Aveiro E, Chiarelli-Neto VM, De-Jesus-Soares A, et al. Efficacy of Reciprocating and Ultrasonic Activation of 6% Sodium Hypochlorite in the Reduction of Microbial Content and Virulence Factors in Teeth With Primary Endodontic Infection. *Int Endod J* 2020;53(5):604–28. Doi: 10.4324/9780203071236.
- 7 Nogueira L S, Amaral G, Silva E J N L, Tinoco J M M, Alves F R F, Sassone L M. Bacterial reduction in oval-shaped root canals after different irrigant agitation methods. *Eur Endod J* 2021;6(3):110–6. Doi: 10.14744/eej.2020.42204.
- 8 Villalta-Briones N, Baca P, Bravo M, et al. A laboratory study of root canal and isthmus disinfection in extracted teeth using various activation methods with a mixture of sodium ypochlorite and etidronic acid. *Int Endod J* 2021;54(2):268–78. Doi: 10.1111/IEJ.13417.
- 9 Sasanakul P, Ampornaramveth R S, Chivatxaranukul P. Influence of Adjuncts to Irrigation in the Disinfection of Large Root Canals. *J Endod* 2019;45(3):332–7. Doi: 10.1016/j.joen.2018.11.015.
- 10 Silva E J N L, Rover G, Belladonna F G, Herrera D R, De-Deus G, Silva F T K. Effectiveness of passive ultrasonic irrigation on periapical healing and root canal disinfection: a systematic review. *Br Dent J* 2019;227(3):228–34. Doi: 10.1038/s41415-019-0532-z.
- 11 Alves FIR F, Andrade-Junior C V, Marceliano-Alves M F, et al. Adjunctive Steps for Disinfection of the Mandibular Molar Root Canal System: A Correlative Bacteriologic, Micro-Computed Tomography, and Cryopulverization Approach. *J Endod* 2016;42(11):1667–72. Doi: 10.1016/j.joen.2016.08.003.
- 12 Fernandes K G C, Silva B B, Boer N C, et al. The effectiveness of three irrigation systems in the *Enterococcus faecalis* reduction after instrumentation with a reciprocating instrument. *Eur J Dent* 2020;14(4):539–43. Doi: 10.1055/s-0040-1714760.
- 13 Garcez A S, Núñez S C, Lage-Marques J L, Cardoso J A O, Ribeiro M S. Efficiency of NaOCl and laser-assisted photosensitization on the reduction of *Enterococcus faecalis* in vitro. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology* 2006;102(4):93–8. Doi: 10.1016/j.tripleo.2006.02.015.
- 14 Soukos N S., Chen P S Y, Morris J T., et al. Photodynamic Therapy for Endodontic Disinfection. *J Endod* 2006;32(10):979–84. Doi: 10.1016/j.joen.2006.04.007.
- 15 Williams J A, Pearson G J, Colles J M. Antibacterial action of photoactivated disinfection {PAD} used on endodontic bacteria in planktonic suspension and in artificial and human root canals. *J Dent* 2006;34(6):363–71. Doi:

- 10.1016/j.jdent.2005.08.002.
- 16 Komine C, Tsujimoto Y. A small amount of singlet oxygen generated via excited methylene blue by photodynamic therapy induces the sterilization of *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 2013;39(3):411–4. Doi: 10.1016/j.joen.2012.11.051.
- 17 Barthel C R, Zimmer S, Zilliges S, Schiller R, Göbel U B, Roulet J-F. In situ antimicrobial effectiveness of chlorhexidine and calcium hydroxide: gel and paste versus gutta-percha points. *J Endod* 2002;28(6):427–30. Doi: 10.1097/00004770-200206000-00002.
- 18 Jardine, A P, Montagner F, Martins RQ, Zaccara I, Kopper PMP. Antimicrobial effect of bioceramic cements on multispecies microcosm biofilm: a confocal laser microscopy study. **Clinical Oral Investigations**, v. 23, n. 3, p.1367-1372, 2019.
- 19 Chávez De Paz L E. Image analysis software based on color segmentation for characterization of viability and physiological activity of biofilms. *Appl Environ Microbiol* 2009;75(6):1734–9. Doi: 10.1128/AEM.02000-08.
- 20 Yang Y, Shen Y, Wang Z, et al. Evaluation of the Susceptibility of Multispecies Biofilms in Dentinal Tubules to Disinfecting Solutions. *J Endod* 2016;42(8):1246–50. Doi: 10.1016/j.joen.2016.05.011.
- 21 Peters O A., Bardsley S, Fong J, Pandher G, Divito E. Disinfection of root canals with photon-initiated photoacoustic streaming. *J Endod* 2011;37(7):1008–12. Doi: 10.1016/j.joen.2011.03.016.
- 22 Virtej A, MacKenzie C R, Raab W H M., Pfeffer K, Barthel C R. Determination of the Performance of Various Root Canal Disinfection Methods after In Situ Carriage. *J Endod* 2007;33(8):926–9. Doi: 10.1016/j.joen.2006.11.025.
- 23 Alves F R F, Marceliano-Alves M F, Sousa J C N, Silveira S B, Provenzano J C, Siqueira Jr J F. Removal of Root Canal Fillings in Curved Canals Using Either Reciprocating Single- or Rotary Multi-instrument Systems and a Supplementary Step with the XP-Endo Finisher. *J Endod* 2016;42(7):1114–9. Doi: 10.1016/j.joen.2016.04.007.
- 24 Azim A A, Aksel H, Zhuang T, Mashtare T, Babu J P., Huang G T J. Efficacy of 4 Irrigation Protocols in Killing Bacteria Colonized in Dentinal Tubules Examined by a Novel Confocal Laser Scanning Microscope Analysis. *J Endod* 2016;42(6):928–34. Doi: 10.1016/j.joen.2016.03.009.
- 25 Carvalho M C, Zuolo M L, Arruda-Vasconcelos R, et al. Effectiveness of XP-Endo Finisher in the reduction of bacterial load in oval-shaped root canals. *Braz Oral Res* 2019;33(e021):1–8. Doi: 10.1590/1807-3107BOR-2019.VOL33.0021.
- 26 Siqueira Jr J F, Rôças I N. Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 1- Current Molecular Technologies for Microbiological Diagnosis. *J Endod* 2005;31(6):411–23. Doi: 10.1097/01.don.0000157990.86638.49.
- 27 Moorer W R, Wesselink P R. Factors promoting the tissue dissolving capability of sodium hypochlorite. *Int Endod J* 1982;15(4):187–96. Doi: 10.1111/j.1365-2591.1982.tb01277.x.
- 28 Byström A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the effect of 0.5 percent sodium hypochlorite in endodontic therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1983;55(3):307–12. Doi: 10.1016/0030-4220(83)90333-x.
- 29 Cunningham W T, Martin H, Pelleu G B., Stoops D E. A comparison of antimicrobial effectiveness of endosonic and hand root canal therapy. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol* 1982;54(2):238–41. Doi: 10.1016/0030-

- 4220(82)90223-7.
- 30 Chow T. W. Mechanical effectiveness of root canal irrigation. *J Endod* 1983;9(11):475–9. Doi: 10.1016/S0099-2399(83)80162-9.

Figure Legend

Figure 1 – 3-D reconstructions (biovolume) of biofilm population showing viable (green) and nonviable (red) cells according to third and experimental group.

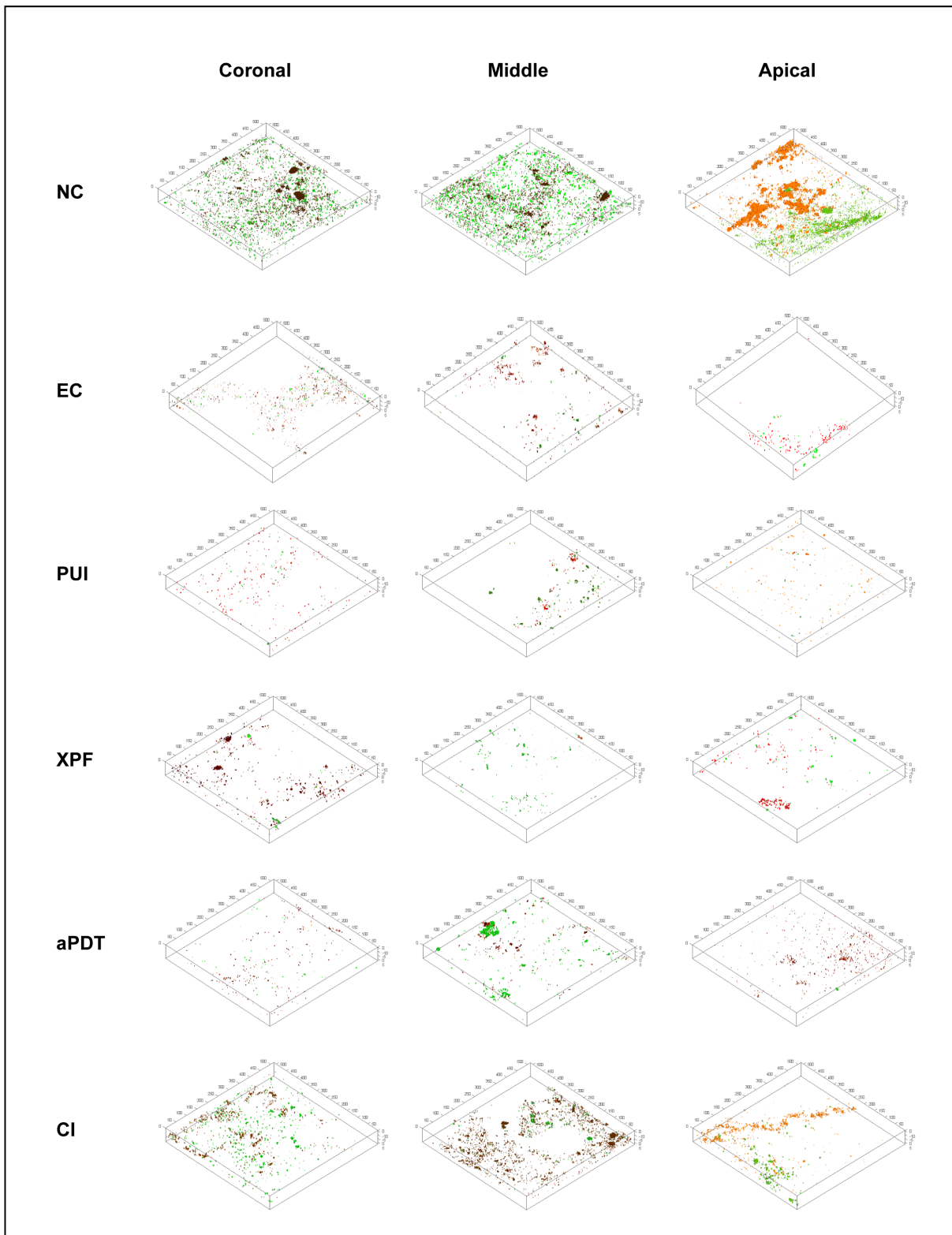


Figure 1 – 3-D reconstructions (biovolume) of biofilm population showing viable (green) and nonviable (red) cells according to third and experimental group.

Table 1 – Additional disinfection protocols according to experimental group

| | PUI (n=10) | EC (n=10) | XPF (n=10) | aPDT (n=10) | CI (n=10) |
|------------|--|--|--|--|--|
| Instrument | E1 Irrisonic Ø20* | Easy Clean Ø30.04** | XP-endo Finisher Ø25*** | Optical fiber Ø20# | NaviTip Ø30## |
| Activation | Ultrasound: Piezon 150###, 30 Hz | VDW Silver ^Δ motor, Reciproc mode | VDW Silver ^Δ motor, DR's choice (100 gcm, 800 rpm) | DUO# laser, 660 nm, 100 mW | Manual, 5 mL Luer-lock## syringe |
| Position | 1 mm short of WL | WL | WL | WL | 2 mm short of WL |
| Movement | back and forth | back and forth | back and forth | back and forth | back and forth |
| Time (s) | 60 (3 x 20) | 60 (3 x 20) | 60 (3 x 20) | 180 | 60 |
| Irrigation | 6 mL of 2.5% NaOCl (2 mL before each activation) + 5 mL 17% EDTA for 5 min + 3 mL distilled water | 6 mL of 2.5% NaOCl (2 mL before each activation) + 5 mL 17% EDTA for 5 min + 3 mL distilled water | 6 mL of 2.5% NaOCl (2 mL before each activation) + 5 mL 17% EDTA for 5 min + 3 mL distilled water | 6 mL of 2.5% NaOCl (2 mL before each activation) + 5 mL 17% EDTA for 5 min + 3 mL distilled water (1.5 mL before aPDT and 1.5 mL after) | 6 mL of 2.5% NaOCl (2 mL before each activation) + 5 mL 17% EDTA for 5 min + 3 mL distilled water |

*Helse Dental Technology, São Paulo, Brazil; **Easy, Belo Horizonte, Brazil; ***FKG, La Chaux-de-Fonds, Switzerland; #MM Optics, São Carlos, Brazil; ##Ultradent, South Jordan, UT; ###Electron Medical Systems, Nyon, Switzerland; ^ΔVDW, Munich, Germany

Table 2 – Median percentage (%) (25th and 75th percentiles) of viable cell biovolume to total biovolume in experimental and control groups.

| | EC | XPF | PUI | aPDT | CI | NC |
|----------------|--------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|
| Coronal | 12.07 ^{Aa} (1.72-40.06) | 18.05 ^{Aa} (1.08-59.31) | 7.33 ^{Aa} (3.20-28.21) | 20.45 ^{Aa} (4.58-42.85) | 23.38 ^{ABa} (12.24-52.06) | 61.30 ^{Ba} (43.14-70.44) |
| Middle | 24.58 ^{Aa} (14.27-38.30) | 46.49 ^{Aa} (10.70-91.86) | 57.29 ^{Aa} (8.58-81.43) | 20.33 ^{Aa} (9.30-88.11) | 26.85 ^{Aa} (3.52-73.76) | 63.48 ^{Aa} (50.83-74.83) |
| Apical | 47.91 ^{Ab} (15.93-81.86) | 49.59 ^{Aa} (31.18-74.56) | 13.86 ^{Aa} (2.64-64.94) | 50.01 ^{Aa} (8.78-85.93) | 57.63 ^{Aa} (38.01-67.98) | 47.09 ^{Aa} (28.29-75.74) |
| Total | 29.99 ^A (7.32-47.64) | 39.48 ^{AB} (5.06-62.82) | 14.68 ^A (6.62-32.03) | 27.96 ^A (9.36-59.02) | 31.11 ^{AB} (23.77-60.07) | 57.71 ^B (46.24-64.11) |

*Different capital letters indicate significant difference in each row; different small letters indicate significant differences in each column ($P \leq 0.05$).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo contribuiu com informações a respeito das características de um biofilme oral, formado *in situ*, no interior de canais radiculares. A caracterização deste biofilme multiespécies, utilizando sequenciamento de alto rendimento (NGS) e ferramentas bioinformática, permitiu a comparação com as comunidades microbianas complexas presentes em infecções endodônticas intrarradiculares.

O modelo experimental empregado parece ter proporcionado a formação de biofilmes multiespécies que se assemelham aos biofilmes encontrados em infecções endodônticas, mostrando-se heterogêneos, quando analisados individualmente. Alguns padrões de diversidade foram observados após o agrupamento das amostras. Estudos futuros devem ser realizados para compreender os mecanismos ecológicos envolvidos na formação destes biofilmes, bem como o papel destes mecanismos na dinâmica das comunidades microbianas.

Além disso, objetivou avaliar a eficácia de diferentes protocolos de limpeza dos canais radiculares infectados por um biofilme multiespécies induzido *in situ*. O método empregado proporcionou a avaliação das mudanças ecológicas causadas no biofilme após o emprego de diferentes protocolos de preparo dos canais radiculares. Os resultados demonstraram a dificuldade que as manobras do preparo químico mecânico (PQM) empregadas durante os tratamentos endodônticos têm de reduzir a viabilidade celular de um biofilme complexo e organizado.

O PQM seguido de uma desinfecção complementar com o Easy Clean, irrigação passiva ultrassônica ou terapia fotodinâmica antimicrobiana reduziu a viabilidade bacteriana nos canais radiculares preparados em comparação com os que não receberam nenhuma intervenção. Já quando a desinfecção complementar foi realizada por meio da irrigação convencional ou da agitação da solução com o XPF, nenhum efeito na viabilidade celular foi verificado. Tal resultado chama a atenção para a dificuldade que o cirurgião dentista tem em desorganizar um biofilme multiespécies, comum nas infecções endodônticas.

Além disso, cabe salientar que a intensidade do efeito da redução da viabilidade celular, proporcionado por três protocolos aqui testados, na patogenicidade do biofilme não foi avaliado. Sendo assim, futuros estudos clínicos são necessários para investigar o papel da redução das cargas bacterianas viáveis no sistema de canais radiculares para o sucesso do tratamento endodôntico.

6 REFERÊNCIAS

AAS, J. A et al. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 11, p. 5721–5732, out. 2005.

ABDULLAH, N. et al. Intraoral appliances for in situ oral biofilm growth: a systematic review. **Journal of Oral Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 1647–757, 1 jan. 2019.

ALVES, F. R. F. et al. Bacterial Community Profiling of Cryogenically Ground Samples from the Apical and Coronal Root Segments of Teeth with Apical Periodontitis. **Journal of Endodontics**, v. 35, n. 4, p. 486–492, 2009.

ALVES, F. R. F. et al. Adjunctive steps for disinfection of the mandibular molar root canal system: A correlative bacteriologic, micro-computed tomography, and cryopulverization approach. **Journal of Endodontics**, v. 42, n. 11, p. 1667–1672, 2016a.

ALVES, F. R. F. et al. Removal of root canal fillings in curved canals using either reciprocating single- or rotary multi-instrument systems and a supplementary step with the XP-endo Finisher. **Journal of endodontics**, v. 42, n. 7, p. 1114–1119, 2016b.

AMATO, M. et al. Curved versus straight root canals: the benefit of activated irrigation techniques on dentin debris removal. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v. 111, n. 4, p. 529–534, 2011.

ANDREANI, Y. et al. Comparison of irrigant activation devices and conventional needle irrigation on smear layer and debris removal in curved canals. (Smear layer removal from irrigant activation using SEM). **Australian Endodontic Journal**, p. 1–7, 2021.

AVEIRO, E. et al. Efficacy of Reciprocating and Ultrasonic Activation of 6% Sodium Hypochlorite in the Reduction of Microbial Content and Virulence Factors in Teeth With Primary Endodontic Infection. **International Endodontic Journal**, v. 53, n. 5, p. 604–628, 4 jan. 2020.

AZIM, A. A. et al. Efficacy of 4 Irrigation Protocols in Killing Bacteria Colonized in Dentinal Tubules Examined by a Novel Confocal Laser Scanning Microscope Analysis. **Journal of Endodontics**, v. 42, n. 6, p. 928–934, 2016.

BAO, P. et al. In Vitro Efficacy of XP-endo Finisher with 2 Different Protocols on Biofilm Removal from Apical Root Canals. **Journal of Endodontics**, v. 43, n. 2, p. 321–325, 2017.

BARBOSA-RIBEIRO, M. et al. Microbiological analysis of endodontically treated teeth with apical periodontitis before and after endodontic retreatment. **Clinical Oral Investigations**, v. online ahe, 2020.

BARTHEL, C. R. et al. In situ antimicrobial effectiveness of chlorhexidine and calcium hydroxide: gel and paste versus gutta-percha points. **Journal of Endodontics**, v. 28, n. 6, p. 427–430, 2002.

BORSATTO, M. C. et al. One-session root canal treatment with antimicrobial photodynamic therapy (aPDT): an in vivo study. **International Endodontic Journal**, v. 49, n. 6, p. 511–518, 2015.

BÖTTCHER, D. E. et al. Evaluation of the effect of Enterococcus faecalis biofilm on the 2% chlorhexidine substantivity: an in vitro study. **Journal of Endodontics**, v. 41, n. 8, p. 1364–1370, 2015.

BYSTRÖM, A.; SUNDQVIST, G. Bacteriologic evaluation of the effect of 0.5 percent sodium hypochlorite in endodontic therapy. **Oral surgery, oral medicine, and oral pathology**, v. 55, n. 3, p. 307–312, mar. 1983.

CARVALHO, M. C. et al. Effectiveness of XP-Endo Finisher in the reduction of bacterial load in oval-shaped root canals. **Brazilian Oral Research**, v. 33, n. e021, p. 1–8, 2019.

CHÁVEZ DE PAZ, L. et al. Strains of Enterococcus faecalis differ in their ability to coexist in biofilms with other root canal bacteria. **International Endodontic Journal**, v. 48, n. 10, p. 916–925, 2015.

CHÁVEZ DE PAZ, L. E. et al. Bacteria recovered from teeth with apical periodontitis after antimicrobial endodontic treatment. **International Endodontic Journal**, v. 36, n. 7, p. 500–508, 2003.

CHÁVEZ DE PAZ, L. E. Image analysis software based on color segmentation for characterization of viability and physiological activity of biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 6, p. 1734–1739, 2009.

CHÁVEZ DE PAZ, L. E. Development of a multispecies biofilm community by four root canal bacteria. **Journal of Endodontics**, v. 38, n. 3, p. 318–323, 2012.

CHOPRA, S.; MURRAY, P. E.; NAMEROW, K. N. A scanning electron microscopic evaluation of the effectiveness of the F-file versus ultrasonic activation of a K-file to remove smear layer. **Journal of endodontics**, v. 34, n. 10, p. 1243-1245, 2008.

CHOW, T. W. Mechanical effectiveness of root canal irrigation. **Journal of Endodontics**, v. 9, n. 11, p. 475–479, 1983.

CIEPLIK, F. et al. Microcosm biofilms cultured from different oral niches in periodontitis patients. **Journal of Oral Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 1–20, 2019.

CUNNINGHAM, W. T. et al. A comparison of antimicrobial effectiveness of endosonic and hand root canal therapy. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology**, v. 54, n. 2, p. 238–241, 1982.

DE ALMEIDA, J. et al. Effectiveness of EDTA and Modified Salt Solution to Detach and Kill Cells from *Enterococcus faecalis* Biofilm. **Journal of Endodontics**, v. 42, n. 2, p. 320–323, 2016.

FARIA-JÚNIOR, N. B. et al. Antibiofilm activity, pH and solubility of endodontic sealers. **International Endodontic Journal**, v. 46, n. 8, p. 755–762, 2013.

FERNANDES, K. G. C. et al. The effectiveness of three irrigation systems in the *Enterococcus faecalis* reduction after instrumentation with a reciprocating instrument. **European Journal of Dentistry**, v. 14, n. 4, p. 539–543, 2020.

FERREIRA, F. B. DE A. et al. Root canal microbiota of dogs' teeth with periapical lesions induced by two different methods. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v. 102, n. 4, p. 564–570, 2006.

FERRER-LUQUE, C. M. et al. Antibiofilm Activity of Diclofenac and Antibiotic Solutions in Endodontic Therapt. **Journal of endodontics**, v. S0099-2399, p. in press, 2021.

GARCEZ, A. S. et al. Efficiency of NaOCl and laser-assisted photosensitization on the reduction of *Enterococcus faecalis* in vitro. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v. 102, n. 4, p. 93–98, 2006.

GOMES, B. P. F. A. et al. Microbiological examination of infected dental root canals. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 19, n. 2, p. 71–76, 2004.

GOMES, B. P. F. A. et al. Microbiomes of Endodontic-Periodontal Lesions before and after Chemomechanical Preparation. **Journal of endodontics**, v. 41, n. 12, p. 1975–1984, dez. 2015.

GOMES, B. P. F. A.; DRUCKER, D. D.; LILLEY, J. D. Endodontic Microflora of Different Teeth in the Same Mouth. **Anareobe**, v. 5, p. 241–245, 1999.

HAAPASALO, M. et al. Irrigation in Endodontics. **Dental Clinics of North America**, v. 54, n. 2, p. 291–312, abr. 2010.

HAAPASALO, M. et al. Irrigation in endodontics. **British dental journal**, v. 216, n. 6, p. 299–303, mar. 2014.

HSIAO, W. W. L. et al. Microbial transformation from normal oral microbiota to acute endodontic infections. **BMC Genomics**, v. 13, n. 1, 2012.

JARDINE, A. P. et al. Antimicrobial effect of bioceramic cements on multispecies microcosm biofilm : a confocal laser microscopy study. **Clinical Oral Investigations**, v. 23, n. 3, p.1367-1372, 2019.

JOY, J. et al. Bacterial Biofilm Removal Using Static and Passive Ultrasonic Irrigation.

Journal of International Oral Health, v. 7, n. 7, p. 42–7, 2015.

KATO, A. S. et al. Investigation of the Efficacy of Passive Ultrasonic Irrigation Versus Irrigation with Reciprocating Activation: An Environmental Scanning Electron Microscopic Study. **Journal of Endodontics**, v. 42, n. 4, p. 659–663, 2016.

KESKIN, C.; DEMIRYÜREK, E. Ö.; ONUK, E. E. Pyrosequencing Analysis of Cryogenically Ground Samples from Primary and Secondary/Persistent Endodontic Infections. **Journal of Endodontics**, v. 43, n. 8, p. 1309–1316, ago. 2017.

KFIR, A. et al. Efficacy of self-adjusting file, XP-endo finisher and passive ultrasonic irrigation on the removal of calcium hydroxide paste from an artificial standardized groove. **Australian Endodontic Journal**, v. 44, n. 1, p. 26–31, 2018.

KOLLI, S. et al. Efficacy of XP-endo Finisher files in endodontics. **Australian Endodontic Journal**, v. 44, n. 1, p. 71–72, 2018.

KOMINE, C.; TSUJIMOTO, Y. A small amount of singlet oxygen generated via excited methylene blue by photodynamic therapy induces the sterilization of *Enterococcus faecalis*. **Journal of Endodontics**, v. 39, n. 3, p. 411–414, 2013.

KONOPKA, K.; GOSLINSKI, T. Photodynamic therapy in dentistry. **Journal of Dental Research**, v. 86, n. 8, p. 694–707, 2007.

LAMONT R.J., KOO H., HAJISHENGALLIS G. The oral microbiota: dynamic communities and host interactions. **Natures Reviews. Microbiology**, v.16, n. 12, p.745-759 2018.

LEONI, G. B. et al. Ex vivo evaluation of four final irrigation protocols on the removal of hard-tissue debris from the mesial root canal system of mandibular first molars. **International Endodontic Journal**, v. 50, n. 4, p. 398–406, 2017.

LI, Y. et al. Evaluation of Cold Plasma Treatment and Safety in Disinfecting 3-week Root Canal *Enterococcus faecalis* Biofilm in Vitro. **Journal of Endodontics**, v. 41, n. 8, p. 1325–1330, 2015.

LÓPEZ-JIMÉNEZ, L. et al. Effects of photodynamic therapy on *Enterococcus faecalis* biofilms. **Lasers in Medical Science**, v. 30, p. 1519–1526, 2015.

MACEDO, R. et al. Cavitation Measurement during Sonic and Ultrasonic Activated Irrigation. **Journal of Endodontics**, v. 40, n. 4, p. 580–583, 2014.

MACHADO, R. et al. Smear layer removal by passive ultrasonic irrigation and 2 new mechanical methods for activation of the chelating solution. **Restorative Dentistry & Endodontics**, v. 46, n. 1, p. 1–11, 2021.

MANG, T. S.; TAYAL, D. P.; BAIER, R. Photodynamic therapy as an alternative treatment for disinfection of bacteria in oral biofilms. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 44, n. 7, p. 588–596, 2012.

MANOIL, D.; AL-MANEI, K.; BELIBASAKIS, G. N. A Systematic Review of the Root Canal Microbiota Associated with Apical Periodontitis: Lessons from Next-Generation Sequencing. **Proteomics. Clinical applications**, p. e1900060, jan. 2020.

MEIRE, M. A. et al. Effectiveness of different laser systems to kill *Enterococcus faecalis* in aqueous suspension and in an infected tooth model. **International Endodontic Journal**, v. 42, n. 4, p. 351–359, 2009.

MOLLER, A. J. R. et al. Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. **European journal of oral sciences**, v. 89, n. 6, p. 475–484, 1981.

MONTAGNER, F.; GOMES, B. P. F. A.; KUMAR, P. S. Molecular fingerprinting reveals the presence of unique communities associated with paired samples of root canals and acute apical abscesses. **Journal of Endodontics**, v. 36, n. 9, p. 1475–1479, 2010.

MOORER, W. R.; WESSELINK, P. R. Factors promoting the tissue dissolving capability of sodium hypochlorite. **International Endodontic Journal**, v. 15, n. 4, p. 187–196, 1982.

MORAES, L. C. et al. Distribution of genes related to antimicrobial resistance in different oral environments: a systematic review. **Journal of endodontics**, v. 41, n. 4, p. 434–441, abr. 2015.

MORAES, L. C. et al. Microbial ecology and predicted metabolic pathways in various oral environments from patients with acute endodontic infections. **International Endodontic Journal**, v. 53, n. 12, p. 1603–17, 2020.

MORSE, D. R. Endodontic microbiology in the 1970s. **International Endodontic Journal**, v. 14, n. 2, p. 69–79, 1981.

MOSADDAD, S. A. et al. Oral microbial biofilms: an update. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 11, p. 2005–2019, nov. 2019.

MUHAMMAD, O. H. et al. Photodynamic therapy versus ultrasonic irrigation: Interaction with endodontic microbial biofilm, an ex vivo study. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 11, n. 2, p. 171–181, 2014.

NAGAI, Y. et al. Effect of antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) on the sterilization of infected dentin in vitro. **Odontology**, v. 106, n. 2, p. 154–161, abr. 2018.

NAIR, P. N. R.; RAMACHANDRAN NAIR, P. N.; NAIR, P. N. R. Light and electron

microscopic studies of root canal flora and periapical lesions. **Journal of Endodontics**, v. 13, n. 1, p. 29–39, 1987.

NEELAKANTAN, P. et al. Biofilms in Endodontics—Current status and future directions. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 8, p. 1–21, ago. 2017.

NOGUEIRA, L. S. et al. Bacterial reduction in oval-shaped root canals after different irrigant agitation methods. **European Endodontic Journal**, v. 6, n. 3, p. 110–6, 2021.

NYIRABUHHORO, P. et al. Seasonal Variability of Conditionally Rare Taxa in the Water Column Bacterioplankton Community of Subtropical Reservoirs in China. **Microbial Ecology**, v. 80, n. 1, p. 14–26, 2020.

OZOK, A. R. et al. Ecology of the microbiome of the infected root canal system: a comparison between apical and coronal root segments. **International endodontic Journal**, v. 45, n. 6, p. 530–541, jun. 2012.

PAQUÉ, F.; BOESSLER, C.; ZEHNDER, M. Accumulated hard tissue debris levels in mesial roots of mandibular molars after sequential irrigation steps. **International Endodontic Journal**, v. 44, n. 2, p. 148–153, 2011.

PARK, O. J. et al. A pilot study of chronological microbiota changes in a rat apical periodontitis model. **Microorganisms**, v. 8, n. 8, p. 1–14, 2020.

PASSARINHO-NETO, J. G. et al. In vitro evaluation of endodontic debris removal as obtained by rotary instrumentation coupled with ultrasonic irrigation. **Australian Endodontic Journal**, v. 32, n. 3, p. 123–128, 2006.

PEDRÓS-ALIÓ, C. The Rare Bacterial Biosphere. **Annual Review of Marine Science**, v. 4, p. 449–446, 2012.

PETERS, O. A. et al. Disinfection of root canals with photon-initiated photoacoustic streaming. **Journal of Endodontics**, v. 37, n. 7, p. 1008–1012, 2011.

PINHEIRO, S. L. et al. Antimicrobial Activity of Photodynamic Therapy Against *Enterococcus faecalis* Before and After Reciprocating Instrumentation in Permanent Molars. **Photomedicine and laser surgery**, v. 34, n. 12, p. 646–651, 2016.

QUAST, C. et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. D1, p. 590–596, 2013.

RICUCCI, D.; SIQUEIRA JR, J. F.; SIQUEIRA, J. F. Biofilms and apical periodontitis: Study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. **Journal of Endodontics**, v. 36, n. 8, p. 1277–1288, 2010.

ROGNES, T. et al. VSEARCH: A versatile open source tool for metagenomics. **PeerJ**, v. 2016, n. 10, p. 1–22, 2016.

ROLPH, H. J. et al. Molecular identification of microorganisms from endodontic infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 9, p. 3282–3289, 2001.

ROSA, R. A. DA et al. Effectiveness of photodynamic therapy associated with irrigants over two biofilm models. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 20, n. August, p. 169–174, 2017.

SÁNCHEZ-SANHUEZA, G. et al. Metagenomic study of bacterial microbiota in persistent endodontic infections using Next-generation sequencing. **International Endodontic Journal**, v. 51, n. 12, p. 1336–1348, dez. 2018.

SANTOS, A. L. et al. Comparing the bacterial diversity of acute and chronic dental root canal infections. **PLoS ONE**, v. 6, n. 11, p. 14–21, 2011.

SASANAKUL, P.; AMPORNARAMVETH, R. S.; CHIVATXARANUKUL, P. Influence of Adjuncts to Irrigation in the Disinfection of Large Root Canals. **Journal of Endodontics**, v. 45, n. 3, p. 332–337, 2019.

SCHLOSS, P. D. et al. Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 23, p. 7537–7541, 2009.

SHEN, Y.; STOJICIC, S.; HAAPASALO, M. Bacterial viability in starved and revitalized biofilms: Comparison of viability staining and direct culture. **Journal of Endodontics**, v. 36, n. 11, p. 1820–1823, 2010.

SHIN, J. M. et al. Deciphering Endodontic Microbial Communities by Next-generation Sequencing. **Journal of Endodontics**, v. 44, n. 7, p. 1080–1087, jul. 2018.

SILVA, E. J. N. L. et al. Effectiveness of passive ultrasonic irrigation on periapical healing and root canal disinfection: a systematic review. **British Dental Journal**, v. 227, n. 3, p. 228–234, ago. 2019.

SILVA, L. A. B. et al. Antimicrobial photodynamic therapy for the treatment of teeth with apical periodontitis: A histopathological evaluation. **Journal of Endodontics**, v. 38, n. 3, p. 360–366, 2012.

SIMEZO, A. P. et al. Comparative Analysis of Dentinal Erosion after Passive Ultrasonic Irrigation versus Irrigation with Reciprocating Activation: An Environmental Scanning Electron Study. **Journal of Endodontics**, v. 43, n. 1, p. 141–146, 2017.

SIQUEIRA, J. F.; RÔÇAS, I. N. Microbiology and treatment of acute apical abscesses. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 2, p. 255–273, 2013.

SIQUEIRA JR, J. F. et al. Checkerboard DNA-DNA hybridization analysis of endodontic infections. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics**, v. 89, n. 6, p. 744–748, 2000a.

SIQUEIRA JR, J. F. et al. Chemomechanical reduction of the bacterial population in the root canal after instrumentation and irrigation with 1%, 2.5%, and 5.25% sodium hypochlorite. **Journal of Endodontics**, v. 26, n. 6, p. 331–334, 2000b.

SIQUEIRA JR, J. F.; RÔÇAS, I. N. Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 2 - Redefining the endodontic microbiota. **Journal of Endodontics**, v. 31, n. 7, p. 488–498, 2005a.

SIQUEIRA JR, J. F.; RÔÇAS, I. N. Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 1- Current Molecular Technologies for Microbiological Diagnosis. **Journal of Endodontics**, v. 31, n. 6, p. 411–423, 2005b.

SIQUEIRA JR, J. F.; RÔÇAS, I. N. Community as the unit of pathogenicity: An emerging concept as to the microbial pathogenesis of apical periodontitis. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v. 107, n. 6, p. 870–878, 2009a.

SIQUEIRA JR, J. F.; RÔÇAS, I. N. Distinctive features of the microbiota associated with different forms of apical periodontitis. **Journal of Oral Microbiology**, v. 1, n. 2009, p. 1–12, 2009b.

SIQUEIRA JR, J. F.; RÔÇAS, I. N.; LOPES, H. P. Patterns of microbial colonization in primary root canal infections. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology**, v. 93, n. 2, p. 174–178, 2002.

SOUKOS, N. S. et al. Photodynamic Therapy for Endodontic Disinfection. **Journal of Endodontics**, v. 32, n. 10, p. 979–984, 2006.

SUNDQVIST, G. Associations between microbial species in dental root canal infections. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 7, n. 5, p. 257–262, 1992.

SWIMBERGHE, R. C. D. D. et al. Biofilm model systems for root canal disinfection: a literature review. **International Endodontic Journal**, v. 52, n. 5, p. 604–628, maio 2019.

TEVES, A. et al. Effectiveness of different disinfection techniques of the root canal in the elimination of a multi-species biofilm. v. 11, n. 11, p. 0–5, 2019.

TRINDADE, A. C. et al. Photodynamic Therapy in Endodontics: A Literature Review. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 33, n. 3, p. 175–182, mar. 2015.

TZANETAKIS, G. N. et al. Comparison of Bacterial Community Composition of Primary and Persistent Endodontic Infections Using Pyrosequencing. **Journal of**

Endodontics, v. 41, n. 8, p. 1226–1233, ago. 2015.

VELSKO, I. M.; SHADDOX, L. M. Consistent and reproducible long-term in vitro growth of health and disease-associated oral subgingival biofilms. **BMC Microbiology**, v. 18, n. 70, p. 1–14, 2018.

VILLALTA-BRIONES, N. et al. A laboratory study of root canal and isthmus disinfection in extracted teeth using various activation methods with a mixture of sodium hypochlorite and etidronic acid. **International Endodontic Journal**, v. 54, n. 2, p. 268–278, 2021.

VIRTEJ, A. et al. Determination of the Performance of Various Root Canal Disinfection Methods after In Situ Carriage. **Journal of Endodontics**, v. 33, n. 8, p. 926–929, 2007.

WADE, W. G.; PROSDOCIMI, E. M. Profiling of Oral Bacterial Communities. **Journal of Dental Research**, v. 99, n. 6, p. 621–629, 2020.

WELCH, J. L. M.; DEWHIRST, F. E.; BORISY, G. G. Biogeography of the Oral Microbiome: The Site-Specialist Hypothesis. **Annual Review of Microbiology**, v. Sep, n. 73, p. 335–358, 2019.

WELCH, J. L. M.; RAMÍREZ-PUEBLA, S. T.; BORISY, G. G. Oral Microbiome Geography: Micron-Scale Habitat and Niche. **Cell Host and Microbe**, v. 28, n. 2, p. 160–168, 2020.

WIGLER, R. et al. Efficacy of XP-endo finisher file in the removal of calcium hydroxide paste from artificial standardized groove in the apical third of oval root canals. **International Endodontic Journal**, v. 50, n. 7, p. 700–705, 2017.

WILLIAMS, J. A.; PEARSON, G. J.; JOHN COLLES, M. Antibacterial action of photoactivated disinfection {PAD} used on endodontic bacteria in planktonic suspension and in artificial and human root canals. **Journal of Dentistry**, v. 34, n. 6, p. 363–371, 2006.

XU, X. et al. Oral cavity contains distinct niches with dynamic microbial communities. **Environmental Microbiology**, v. 17, n. 3, p. 699–710, 2015.

YANG, Y. et al. Evaluation of the Susceptibility of Multispecies Biofilms in Dentinal Tubules to Disinfecting Solutions. **Journal of Endodontics**, v. 42, n. 8, p. 1246–1250, 2016.

YEUNG, W. et al. Assessment of smear layer removal protocols in curved root canals. **Australian Endodontic Journal**, v. 40, n. 2, p. 66–71, 2014.

ZEHNDER, M. et al. FISHing for gutta-percha-adhered biofilms in purulent post-treatment apical periodontitis. **Molecular oral microbiology**, v. 32, n. 3, p. 226–235, 2017.

7 APÊNDICES

APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

As informações contidas neste termo foram fornecidas pelo orientador Prof. Dr. Patrícia Maria Poli Kopper Móra com o objetivo de convidar o voluntário a participar, ter conhecimento do projeto a ser realizado, e de que maneira poderá contribuir para o trabalho de pesquisa. Estando ciente disso, o voluntário autoriza a sua participação, tendo concordado sem qualquer coação.

I. TÍTULO DA PESQUISA

“CARACTERIZAÇÃO TAXONÔMICA DE UM BIOFILME MULTIESPÉCIES FORMADO *IN SITU* E AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE BACTERIANA EM CANAIS RADICULARES SUBMETIDOS A DIFERENTES PROTOCOLOS DE DESINFECÇÃO”

II. JUSTIFICATIVA

Considerando o objetivo do tratamento endodôntico – de promover a saúde dos tecidos periapicais através do controle da infecção do sistema de canais – é importante que seja investigada a capacidade de limpeza de diferentes protocolos de irrigação final dos canais radiculares, após a conclusão do preparo químico mecânico, por meio da microscopia confocal de varredura a laser.

III. OBJETIVOS

Este trabalho tem o objetivo comparar a efetividade de diferentes protocolos de irrigação final em canais radiculares infectados por biofilme multiespécies, “*in situ*”.

IV. PROCEDIMENTOS

A coleta de amostra de bactérias é simples. O voluntário deverá utilizar um dispositivo intrabucal (aparelho ortodôntico móvel) contendo raízes de dentes humanos durante 21 dias. O aparelho deverá ser removido durante a alimentação e os procedimentos de higiene oral e, imediatamente após, recolocado.

V. DESCONFORTOS OU RISCOS ESPERADOS

Não há risco previsto decorrente da utilização do aparelho removível. Uma discreta halitose poderá ser observada pelo participante da pesquisa que utilizar o dispositivo durante o período experimental, mas que é eliminada por uma higiene bucal adequada. O dispositivo intrabucal pode causar um leve desconforto, que é, entretanto, semelhante ao desconforto causado por um aparelho ortodôntico móvel. Durante todo o período da pesquisa, acompanhamentos serão realizados, para verificar as condições do aparelho e da saúde bucal dos voluntários.

VI. GARANTIA DE ESCLARECIMENTOS

Você tem toda a liberdade de pedir esclarecimentos sobre a metodologia antes e durante a pesquisa, podendo ou não concordar em participar. Caso você não queira participar do estudo, não haverá prejuízo. Se você se recusar a participar ou se você quiser desistir, em qualquer fase da pesquisa, não será penalizado.

VII. GARANTIA DE SIGILO

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

Eu, _____

_____ certifico que, tendo lido as informações acima e suficientemente esclarecido(a) de todos os itens pela Prof. Dr. Patrícia Maria Poli Kopper Morá, estou plenamente de acordo com a realização do experimento. Assim, eu autorizo a execução da pesquisa, exposta acima, em mim.

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 20__.

Nome: _____

RG: _____

Assinatura do Voluntário: _____

Assinatura do Pesquisador Responsável: _____

ATENÇÃO: Esse termo de doação será impresso em duas cópias, sendo uma de propriedade do participante da pesquisa, e outra de propriedade dos pesquisadores. 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, escreva para o Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS, endereçado a Av. Paulo Gama, 110 - 7º andar - Porto Alegre/RS - CEP: 90040-060 - Fone: (51) 3308.3738. e-mail: etica@propesq.ufrgs.br.

APÊNDICE B - Termo de doação de dentes humanos

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

TERMO DE DOAÇÃO DE DENTE

Prezado Sr(a),

Eu, _____, residente à _____, no _____, aceito doar o dente _____, para o pesquisador Felipe Barros Matoso da Faculdade de Odontologia da UFRGS, ciente que o mesmo será utilizado para a realização da pesquisa “**CARACTERIZAÇÃO TAXONÔMICA DE UM BIOFILME MULTIESPÉCIES FORMADO *IN SITU* E AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE BACTERIANA EM CANAIS RADICULARES SUBMETIDOS A DIFERENTES PROTOCOLOS DE DESINFECÇÃO**”. Estou ciente de que, caso eu tenha perguntas sobre este estudo e/ou sobre o órgão doado, poderei solicitar informações à professora Patrícia Maria Poli Kopper Móra (pesquisador responsável) através do telefone (51) 3308 5191. Estou ciente que caso não concorde em doar o dente para a pesquisa, não haverá qualquer interferência em meu atendimento odontológico.

_____, ____ de _____ de 201__.

Assinatura do doador

Testemunha

Testemunha

8 ANEXOS

ANEXO A- Carta de autorização do uso das dependências do Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da UFRGS.



CENTRO DE MICROSCOPIA E MICROANÁLISE – UFRGS
Av. Bento Gonçalves, 9500 – Setor 1 – Prédio 43177
CEP 91510-970 – Agronomia – Porto Alegre / RS
Telefone: (51) 3308.7056
www.cme.ufrgs.br



Porto Alegre, 28 de agosto de 2018.

DECLARAÇÃO

Declaro que o projeto de pesquisa “*Avaliação da efetividade de diferentes protocolos de limpeza final em canais radiculares infectados por biofilme oral multiespécie in situ*”, coordenado pela Profa. Dra. Patrícia Kopper da Faculdade de Odontologia, está cadastrado no Centro de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal do Rio Grande do Sul para a realização de análises de microscopia eletrônica.

Atenciosamente,

Prof. Daniel Lorscheitter Baptista
Diretor do CMM


ANEXO B - Carta de autorização do uso das dependências do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Bucal (LABIM) da UFRGS.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Odontologia

Porto Alegre, 27 de agosto de 2018.

Declaro para os devidos fins que projeto de pesquisa intitulado "*Avaliação da efetividade de diferentes protocolos de limpeza final em canais radiculares infectados por biofilme oral multiespécie in situ*" será realizado no Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Bucal (LABIM).

Atenciosamente,


Clarissa C. Fatturi Parolo

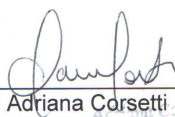
**ANEXO C- Autorização do ambulatório de cirurgia e traumatologia da
Faculdade de Odontologia da UFRGS.**

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Odontologia

Porto Alegre, 27 de agosto de 2018.

Declaro para os devidos fins que os pesquisadores do projeto intitulado "*Avaliação da efetividade de diferentes protocolos de limpeza final em canais radiculares infectados por biofilme oral multiespécie in situ*" poderão recrutar participantes para a pesquisa no ambulatório de cirurgia e traumatologia bucomaxilofacial da FO-UFRGS.

Atenciosamente,



Adriana Corsetti

Professora UFRGS
CRQ-RS 12920

ANEXO D - Unidade de Pesquisa Laboratorial do Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre



Porto Alegre, 17 de setembro de 2018

DECLARAÇÃO

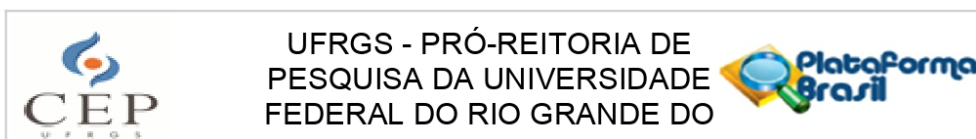
Declaro que a Unidade de Pesquisa Laboratorial, do Centro de Pesquisa Experimental – Hospital de Clínicas de Porto Alegre realiza análise de microbioma por sequenciamento do gene codificante do rRNA 16s, utilizando sistema PGM da Thermo Fisher e tem condições de dar suporte ao projeto:

AVALIAÇÃO DA EFETIVIDADE DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE LIMPEZA FINAL EM CANAIS RADICULARES INFECTADOS POR BIOFILME ORAL MULTIESPÉCIE IN SITU
Coordenação: Patricia Kopper

Atenciosamente,

Michael Andrades, PhD
Chefe da Unidade de Pesquisa Laboratorial
51 33598922

ANEXO F - Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UFRGS.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da efetividade de diferentes protocolos de limpeza final em canais radiculares infectados por biofilme oral multiespécie in situ.

Pesquisador: Patrícia Maria Poli Kopper Móra

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 01688918.8.0000.5347

Instituição Proponente: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

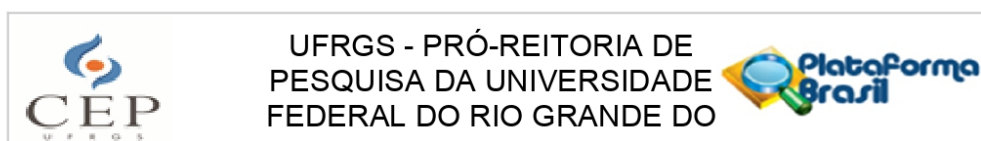
Número do Parecer: 3.099.627

Apresentação do Projeto:

A presente pesquisa intitulada "Avaliação da efetividade de diferentes protocolos de limpeza final em canais radiculares infectados por biofilme oral multiespécie in situ." é coordenada pela profa. Patrícia Maria Poli Kopper Mora da FO-UFRGS, e conta com a participação dos profs. Fabiana Soares Grecca e Francisco Montagner, também da FO-UFRGS, e dos alunos de doutorado do PPG Odontologia Felipe Barros Matoso, Alexandre Pompermayer Jardine e Ramiro Martins Quintana. Todos os pesquisadores foram cadastrados no formulário da PB.

Como justificativa do estudo, os autores reportam a partir de dados da literatura que a organização dos microrganismos orais sob a forma de um biofilme também no interior dos canais radiculares torna as comunidades bacterianas mais resistentes quando do preparo químico mecânico (PQM) na Endodontia. Assim, ao final do PQM faz-se necessária uma limpeza final, a qual pode seguir diferentes protocolos, sem existir ainda um consenso sobre qual o protocolo ideal. Neste sentido, o projeto de pesquisa buscará investigar desfechos relacionados ao comportamento do biofilme multiespécies após a limpeza do canal radicular por meio da ativação da solução irrigadora pela irrigação ultrassônica passiva (controle) em comparação ao uso dos instrumentos XP-Endo Finisher (XFP) e Easy Clean (EC), e com o uso da terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT).

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: 3.099.627

Metodologicamente, o estudo seguirá delineamento transversal in vitro com etapa in situ.

Para tanto, serão utilizadas 72 raízes palatinas de dentes molares superiores humanos, distribuídas em 20 dispositivos intrabucais, a serem utilizados 10 participantes (2 dispositivos por participante), e quando se induzirá a formação do biofilme multiespécies.

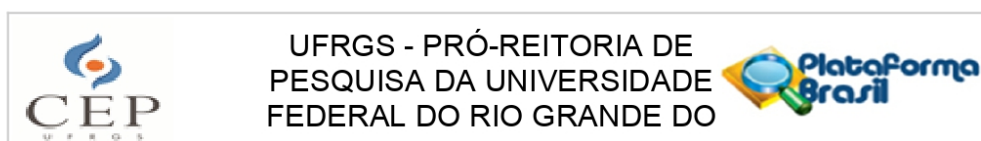
- A doação dos dentes será buscada junto a voluntários de ambos os sexos, idade entre 18 e 40 anos, atendidos na disciplina de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial da FO-UFRGS. O paciente será convidado a doar o elemento dentário extraído (por razão independente da pesquisa), e concordando, deverá assinar Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) e Termo de Doação de Dente. Cada participante poderá doar apenas um elemento dentário. Após obtenção dos dentes, os mesmos terão suas raízes palatinas seccionadas ao nível da junção cimento-esmalte, estimando-se obter um comprimento radicular de 10mm. As raízes serão submetidas a limpeza e preparo para ampliação dos canais radiculares, e após seccionadas no sentido longitudinal para permitir o polimento e esterilização das amostras. Para o controle de esterilidade, após o processo de esterilização, duas raízes (n=2) serão selecionadas, de forma aleatória, e imersas em meio de cultura BHI caldo. Após 24 horas a 37°C, será observada a presença ou ausência de turvação do meio. A confirmação da ausência de microrganismos será realizada por análise em microscopia confocal de varredura a laser (CLSM).

- 10 voluntários (de ambos os sexos, maiores de 18 anos de idade, sistemicamente saudáveis e com adequado controle de higiene bucal) serão buscados, por meio de cartazes, entre os estudantes de graduação e pós-graduação da FO-UFRGS para utilizar os dispositivos intrabucais, durante 21 dias, para a formação do biofilme no sistema radicular das raízes preparadas. Concordando em participar, os voluntários deverão assinar TCLE.

- Cada participantes utilizará 2 dispositivos contendo as raízes dentárias, confeccionados a partir de moldagens do arco superior, e com o uso de fios ortodônticos e resina acrílica incolor. Um dispositivo será instalado do lado direito, contendo 4 raízes, e o outro, do lado esquerdo, contendo 3 raízes, ambos na face vestibular da região dos primeiros molares superiores. Os voluntários serão orientados a utilizar o dispositivo continuamente (dia e noite), exceto quando forem ingerir algum alimento ou bebida e realizar a higiene bucal. E, que quando removerem o dispositivo da boca, deverão mantê-lo em um estojo plástico, envolto por algodão umedecido em água destilada.

Após 21 dias, os dispositivos serão recolhidos e as raízes separadas das placas, identificadas de acordo com o grupo experimental.

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: 3.099.627

- Uma das raízes de cada voluntário será congelada a -20°C para posterior realização do sequenciamento de alto rendimento do biofilme ($n=10$), na Unidade de Pesquisa Laboratorial do Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. A finalidade é a caracterização do biofilme oral coletado dos voluntários.

- Controle negativo ($n=10$): após a remoção do dispositivo, não haverá limpeza do sistema radicular, e as metades serão imediatamente separadas e levadas a microscopia confocal.

As demais raízes terão seus canais preparados, e, então, serão distribuídas aleatoriamente nos seguintes protocolos:

- GPUI – Irrigação Ultrassônica Passiva ($n=10$);
- GEC – Easy Clean ($n=10$);
- GXPF – XP-endo Finisher ($n=10$);
- GaPDT – Terapia fotodinâmica antimicrobiana ($n=10$);
- GPC – grupo preparo convencional ($n=10$).

Ao final dos protocolos de limpeza, cada a raiz será separada nas duas metades que serão levadas para análise por 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. A análise da formação do biofilme multiespécie será realizada por meio de hibridização de DNA.

As etapas laboratoriais da pesquisa serão conduzidas no Laboratório de Endodontia e Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Bucal (LABIM) da FO-UFRGS. A análise em microscopia confocal será realizada no Centro de Microscopia e Microanálise da UFRGS.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Geral: Comparar a efetividade de diferentes protocolos de limpeza final em canais radiculares infectados por biofilme multiespécie.

Objetivos Específicos:

- a) Analisar de forma descritiva as espécies microbianas encontradas nas amostras de biofilme oral, conforme o método de sequenciamento de alto rendimento;
- b) Comparar o biofilme multiepécies formado "in situ", após o emprego de diferentes protocolos de limpeza do canal radicular, quanto a viabilidade celular, por meio de microscopia confocal de varredura a laser;

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: 3.099.627

c) Quantificar o biovolume de células microbianas, a altura e a cobertura do substrato pelo biofilme multipécies formado "in situ", após o emprego de diferentes protocolos de limpeza do canal radicular, por meio de microscopia confocal de varredura a laser.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

De forma geral, no formulário da PB é informado: "Não há riscos previsíveis associados à pesquisa. Os riscos estão associados a quebra de sigilo que serão minimizados pela codificação dos participantes que doarão os dentes."

1) Em relação ao voluntário que doar o dente:

- Não são mencionados riscos no texto do projeto.

- No TCLE para este voluntário, informa-se: "Não são esperados desconfortos para o participante 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. (...) 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."

- E no termo de doação de dentes consta: "Estou ciente de que, caso eu tenha perguntas sobre este estudo e/ou sobre o órgão doado, poderei solicitar informações à professora Patrícia Maria Poli Kopper Móra (pesquisador responsável) através do telefone (51)

3308 5191. Estou ciente que caso não concorde em doar o dente para a pesquisa, não haverá qualquer interferência em meu atendimento odontológico."

2) Em relação ao participante que utilizará o dispositivo intrabucal:

- No projeto (página 21) é informado que "Os voluntários assinarão um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexo 8) e, de acordo com este, possuirão liberdade para desistir da pesquisa a qualquer momento. Neste termo constarão todas as informações a respeito da metodologia envolvida no trabalho, seus objetivos, critérios de seleção e exclusão dos voluntários e análise crítica dos riscos."

- No TCLE consta: "Não há risco previsto decorrente da utilização do aparelho removível.

Uma discreta halitose poderá ser observada pelo participante da pesquisa que utilizar o dispositivo durante o período experimental, mas que é eliminada por uma higiene bucal adequada. O dispositivo intrabucal pode causar um leve desconforto, que é, entretanto, semelhante ao desconforto causado por um aparelho ortodôntico móvel. Durante todo o período da pesquisa,

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: 3.099.627

acompanhamentos serão realizados, para verificar as condições do aparelho e da saúde bucal dos voluntários.” e “Garantia de Sigilo: Apesar dos resultados microbiológicos serem divulgados publicamente para fins acadêmicos e científicos, será preservada a sua privacidade (seu nome não será revelado) quanto aos dados confidenciais que possam ser envolvidos na pesquisa.”

VERSÃO 1: Toda pesquisa envolvendo seres humanos envolve riscos, ainda que estes sejam mínimos. Assim, a redação de que NÃO há riscos deve ser revista.

Além disso, solicita-se adequações quanto:

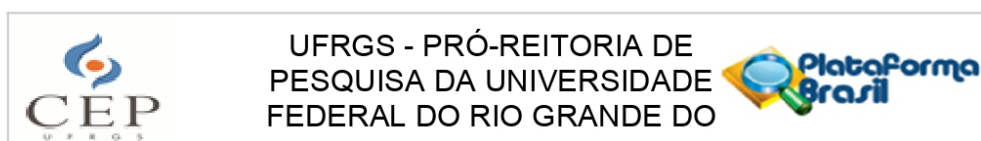
- No formulário da PB, esclarecer os riscos tanto para os participantes que doarem dentes como para os que utilizarão os dispositivos;
- Termo de doação do dente: a sentença de que não haverá interferência no atendimento odontológico pode ser removida, uma vez que esse termo será assinado após o TCLE, e portanto, somente por aqueles que aceitarem realizar a doação.
- A informação no TCLE ao participante que utilizará os dispositivo intrabucal deve ser revista e ampliada. Por exemplo, deve-se informar que: a) o voluntário será moldado para confecção dos dispositivos, e que os mesmos serão instalados na região de molares superiores; e, b) esclarecer que os riscos são mínimos, tais como halitose, desconforto, alergia a resina acrílica, etc.
- Ainda, como neste TCLE é informado que haverá “acompanhamentos” dos voluntários, os autores devem deixar claro como este se dará e em que momentos.

Por fim, recomenda-se também que os riscos sejam descritos, de forma semelhante, em todos os documentos relacionados ao projeto (formulário PB, texto do projeto e TCLEs).

VERSÃO 2: Os autores fizeram adequações quanto aos riscos no projeto sobre os voluntários que doarão os dentes. No entanto:

- No formulário da PB ainda consta: “Não há riscos previsíveis associados à pesquisa. Os riscos estão associados a quebra de sigilo que serão minimizados pela codificação dos participantes que doarão os dentes.” Assim, ainda faz necessário acrescentar os riscos aos participantes que utilizarão os dispositivos intrabucais E remover a descrição de que NÃO há riscos decorrentes da pesquisa.
- Além disso, na descrição dos riscos aos voluntários que utilizarão os dispositivos intrabucais no projeto, os riscos não estão padronizados com aqueles presentes no TCLE (discreta halitose, desconforto, etc.). Tal descrição deve ser uniforme em todos os documentos do estudo: projeto, TCLE e formulário da PB.
- Por fim, os pesquisadores devem esclarecer como será o acompanhamento dos voluntários (citado no TCLE aos participantes que utilizarão o dispositivo intrabucal), deixando claro como

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: 3.099.627

este se dará e em que momentos.

RESPOSTA: Os pesquisadores realizaram todas as adequações solicitadas, realizando a padronização das informações em todos os documentos do projeto, e, especialmente informando que o acompanhamento será feito pelo pesquisador Felipe Matoso, sendo fornecido telefone para contato no TCLE, e informando que se houver custos decorrentes, estes serão ressarcidos.

PENDÊNCIAS ATENDIDAS.

Benefícios:

No formulário da PB consta: "Os benefícios aos participantes da pesquisa serão indiretos. O presente projeto de pesquisa visa auxiliar os cirurgiões-dentistas e pesquisadores a determinar o melhor protocolo final de limpeza dos canais radiculares e que mais se adequa para o objetivo do tratamento endodôntico. Tal conhecimento resultará em um maior índice de manutenção do estado de saúde dos tecidos que envolvem o dente."

Já no texto do projeto, não são esclarecidos benefícios aos participantes, sendo referido apenas que estes serão apresentados nos respectivos TCLEs.

No TCLE ao participante que doar o dente consta o mesmo texto apresentado no formulário da PB; enquanto no TCLE ao participante que utilizar os dispositivos não são descritos claramente os possíveis benefícios.

VERSÃO 1: Os benefícios esperados aos participantes da pesquisa são indiretos. No entanto, estes devem ser claramente apresentados em todos os documentos relacionados ao projeto. Portanto, solicita-se a inclusão dos mesmos nos TCLEs, em linguagem acessível, e também no corpo do projeto de pesquisa.

RESPOSTA: Os benefícios foram acrescentados nos TCLEs e no corpo do projeto. PENDÊNCIA ATENDIDA.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A presente pesquisa tem relevância científica e está embasada por literatura pertinente e atual. Em relação a seu desenvolvimento, a metodologia apresentada subsidia os objetivos do estudo, e, embora seja prevista ser realizada em sua maior parte laboratorialmente, contará com a participação de indivíduos em duas frentes: a) doação de dentes; e b) uso de dispositivos intrabucais. Portanto, faz-se necessária a observância as resoluções CNS/MS nos. 466/2012 e 510/2016, em relação aos seus aspectos éticos.

1) O pesquisador Felipe Barros Matoso está cadastrado na PB e consta na capa do projeto termos

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: 3.099.627

do estudo; porém não consta na lista da equipe executora.

VERSÃO 1: Solicita-se esclarecimento da participação do mesmo, e sua inclusão na equipe relacionada no projeto (página 5).

RESPOSTA: O nome do pesquisador Felipe Barros Matoso foi incluído na equipe do estudo no projeto, e identificado como aluno de Doutorado em Endodontia.

PENDÊNCIA ATENDIDA.

2) No formulário da PB, na descrição dos grupos do estudo e amostra, existem inconsistências:

VERSÃO 1:

a) É apresentado que o grupo a ser submetido ao Sequenciamento será composto por 20 indivíduos. No entanto, pela descrição dos grupos no projeto, é informado que este grupo será composto por 10 raízes. Esclarecer.

VERSÃO 2: No projeto é informado: "Uma das raízes será congelada a -20oC para posterior realização do sequenciamento de alto rendimento do Biofilme." e "As seis raízes remanescentes de cada voluntário, contaminadas por biofilme multiespécie, serão distribuídas randomicamente em cinco grupos experimentais e um grupo controle negativo." Essas informações sugerem que somente 10 raízes (amostras) serão submetidas ao sequenciamento. Porém, no formulário da PB ainda consta como 20 raízes.

RESPOSTA: O numero de raízes que compõe o grupo foi corrigido para 10 no formulário da PB. PENDÊNCIA ATENDIDA.

b) O grupo controle negativo não consta na lista dos grupos;

VERSÃO 2: O grupo não foi adicionada ao formulário da PB. Porém é previsto no projeto como: "As raízes pertencentes ao grupo controle negativo (GCnegativo – n=10) não receberão tratamento de limpeza. Imediatamente após a sua remoção do dispositivo, serão separadas em duas metades e estas serão levadas ao CLSM."

RESPOSTA: O grupo controle negativo foi acrescentado no formulário da PB. PENDÊNCIA ATENDIDA.

c) O grupo de participantes que utilizará os dispositivos deverá constar entre os grupos;

RESPOSTA: Os pesquisadores fizeram a inclusão deste grupo. PENDÊNCIA ATENDIDA.

d) E, por fim, o número amostral do estudo é 82 (72 voluntários que doarão os dentes + 10

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: 3.099.627

participantes que utilizarão os dispositivos).

RESPOSTA: Os pesquisadores fizeram a correção no número amostral. PENDÊNCIA ATENDIDA.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

TCLE:

a) TCLE aos voluntários que doarem dentes: os autores apresentaram modelo do termo a ser apresentado aos indivíduos que doarem seus dentes para a pesquisa. Este termo será aplicado após a extração do dente. Porém, ajustes no texto do termo são necessários: VERSÃO 1:

- Deve ser redigido sob a forma de convite (p.ex.: Você está sendo convidado a participar, por meio da doação do seu dente extraído, do estudo....) e direcionado ao participante ao longo de todo texto [p.ex: "(...) os desconfortos esperados poderão ser aqueles resultados do procedimento de extração do dente, e que podem ocorrer independentemente da SUA participação neste estudo."];

- Ao final o participante não certifica, ele concorda em participar;

- Corrigir número de telefone do CEP UFRGS (3308 3738).

- Atender as pendências apontadas no item de Riscos e Benefícios deste parecer.

VERSÃO 2: Os autores realizaram a adequação dos riscos e benefícios; no entanto as demais alterações não foram realizadas.

RESPOSTA: Na nova versão submetida, os autores apresentaram TCLE contendo todas as informações de forma completa e detalhada, atendendo a todas as pendências.

PENDÊNCIAS ATENDIDAS.

b) TCLE aos participantes que utilização o dispositivo intrabucal: foi apresentado modelo do referido termo, porém com algumas inadequações:

VERSÃO 1:

- Substituir o termo "pelo orientador" por "pesquisadora principal" ao início do termo;

- Deve ser redigido sob a forma de convite e direcionado ao participante ao longo de todo texto [p.ex: "Você deverá utilizar um dispositivo(...)];

- Ao final o participante não certifica, ele concorda em participar;

- Remover a sentença: "Assim, eu autorizo a execução da pesquisa, exposta acima, em mim.";

- Remover campo para coleta do RG do voluntário;

- Atender as pendências apontadas no item de Riscos e Benefícios deste parecer.

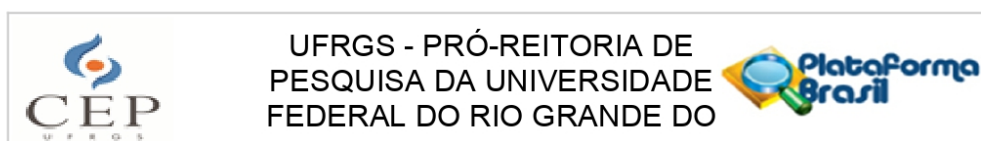
VERSÃO 2: Os autores realizaram a adequação dos riscos e benefícios; no entanto as demais alterações não foram realizadas.

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: 3.099.627

RESPOSTA: Foi apresentado novo TCLE contendo todas as informações de forma completa e detalhada, atendendo a todas as pendências.

PENDÊNCIAS ATENDIDAS.

Termo de Doação de Dentes: os autores apresentaram modelo o termo a ser fornecido aos participantes que doarem seus dentes, mas devem adequar o mesmo de forma que: **VERSÃO 1:**

- a) seja removido o cabeçalho relacionando a pesquisa como sendo proposta pela UFRGS, FO-UFRGS e PPGOdontologia;
- b) remover a sentença "Prezado Sr(a),";
- c) remover campo para coleta dos dados de residência do voluntário;
- d) remover sentença sobre a não concordância em doar o dente (ver comentário na sessão de Riscos e Benefícios deste parecer).

VERSÃO 2: Os autores realizaram a adequação dos riscos e benefícios; no entanto as demais alterações não foram realizadas.

RESPOSTA: Foi apresentado novo termo de doação de dentes atendendo a todas as pendências.

PENDÊNCIAS ATENDIDAS.

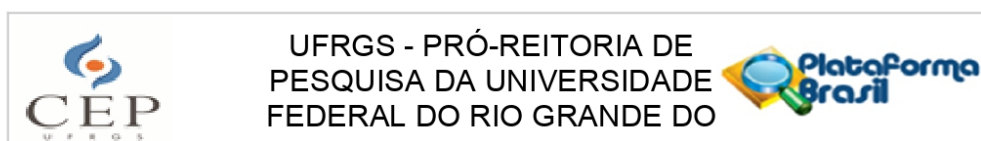
Cartas de anuência: foram apresentadas as respectivas cartas de anuência assinadas pelos responsáveis pela disciplina de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial da FO-UFRGS (local de coleta dos dentes doados); LABIM FO-UFRGS(local das análises microbiológicas); CMM UFRGS (local de realização da microscopia confocal); e da Unidade de Pesquisa Laboratorial do Centro de Pesquisa Experimental do HCPA (local de realização do sequenciamento do gene 16s). Uma vez que a professora Patrícia Kopper Mora é integrante do grupo de professores de Endodontia, não faz-se necessária carta de anuência para a utilização do laboratório da disciplina.

Cartaz de chamamento de voluntários: foi apresentado modelo de cartaz para o chamamento de voluntários (alunos de graduação e pós-graduação da FO-UFRGS) para participar como usuários dos dispositivos intrabucais. Texto adequado.

Cronograma: adequado. O início da seleção da amostra (dentes) está previsto para 01/07/19.

Orçamento: adequado. Os custos relacionados ao projeto foram estimados em R\$ 16.603,96, a serem custeados pela pesquisadora principal.

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: 3.099.627

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Todas as pendências foram atendidas adequadamente, e o estudo encontra-se em acordo com as resoluções CNS/MS no. 466/2012 e 510/2016. Pela aprovação.

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

| Tipo Documento | Arquivo | Postagem | Autor | Situação |
|---|---|------------------------|------------------------------------|----------|
| Informações Básicas do Projeto | PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1243553.pdf | 15/12/2018 00:33:08 | | Aceito |
| Outros | RespostaParecerCEP.pdf | 15/12/2018 00:32:42 | Patrícia Maria Poli Kopper Móra | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador | PROJETOcep.pdf | 15/12/2018 00:31:24 | Patrícia Maria Poli Kopper Móra | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TERMOdoador.pdf | 15/12/2018 00:30:59 | Patrícia Maria Poli Kopper Móra | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TERMOdoacao.pdf | 15/12/2018 00:30:49 | Patrícia Maria Poli Kopper Móra | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TERMOaparelho.pdf | 15/12/2018 00:30:34 | Patrícia Maria Poli Kopper Móra | Aceito |
| Folha de Rosto | folhadeRostoAssinada.pdf | 23/10/2018 18:26:58 | Patrícia Maria Poli Kopper Móra | Aceito |
| Parecer Anterior | PARECERcompesq.pdf | 23/10/2018 13:03:45 | Patrícia Maria Poli Kopper Móra | Aceito |
| Declaração de Instituição e Infraestrutura | CARTAlabim.jpg | 23/10/2018 12:53:24 | Patrícia Maria Poli Kopper Móra | Aceito |
| Declaração de Instituição e Infraestrutura | CARTAhcpa.png | 23/10/2018 12:53:14 | Patrícia Maria Poli Kopper Móra | Aceito |
| Declaração de Instituição e Infraestrutura | CARTAcmm.jpg | 23/10/2018 12:53:05 | Patrícia Maria Poli Kopper Móra | Aceito |
| Declaração de Instituição e | CARTAcirurgia.jpg | 23/10/2018 12:52:55 | Patrícia Maria Poli Kopper Móra | Aceito |

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: 3.099.627

| | | | | |
|----------------|-------------------|------------------------|------------------------------------|--------|
| Infraestrutura | CARTAcirurgia.jpg | 23/10/2018 12:52:55 | Patrícia Maria Poli Kopper Móra | Aceito |
|----------------|-------------------|------------------------|------------------------------------|--------|

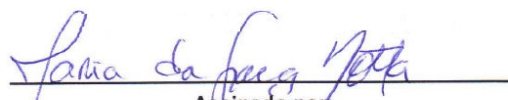
Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PORTO ALEGRE, 21 de Dezembro de 2018


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