



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

PRISCILA AMANDA FRANCISCO

PANORAMA DO BIOFILME NAS INFECÇÕES ENDODÔNTICAS

Piracicaba

2017

PRISCILA AMANDA FRANCISCO

PANORAMA DO BIOFILME NAS INFECÇÕES ENDODÔNTICAS

Monografia apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, como requisito para a obtenção do título de especialista em Endodontia

Orientadora: Profa. Dra. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes

Piracicaba

2017

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Marilene Girello - CRB 8/6159

F847p Francisco, Priscila Amanda, 1987-
Panorama do biofilme nas infecções endodônticas / Priscila Amanda
Francisco. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes.
Trabalho de Conclusão de Curso (especialização) – Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Endodontia. 2. Bactérias. 3. Biofilme. I. Gomes, Brenda Paula Figueiredo de
Almeida. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de
Piracicaba. III. Título.

Informações adicionais, complementares

Palavras-chave em inglês:

Endodontics

Bacteria

Biofilms

Área de concentração: Endodontia

Titulação: Especialista

Banca examinadora:

José Flávio Affonso de Almeida

Adriana de Jesus Soares

Data de entrega do trabalho definitivo: 07-02-2017

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família, por apoiarem meus sonhos e estarem sempre ao meu lado, ajudando-me de todas as formas possíveis. Minha gratidão e amor por vocês são imensuráveis.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes, pela orientação, pelos ensinamentos, pela compreensão e por toda a confiança depositada em mim.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, na pessoa do seu Diretor, Guilherme Elias Pessanha Henriques, pela estrutura e suporte necessário à realização desse curso.

Aos professores do curso de especialização em Endodontia da FOP – Unicamp, Professora Adriana de Jesus Soares, Professor Alexandre Augusto Zaia, Professora Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes, Professor Caio Cezar Randi Ferraz e Professor José Flávio Affonso de Almeida, por todo o conhecimento compartilhado.

Às queridas amigas Janaina de Oliveira Leite, Maria Helidia Neves Pereira e Joana, pela organização e ajuda com os pacientes, pela paciência, pelas confraternizações e pelos momentos de descontração.

Aos pós-graduandos, Aline Cristina Gomes, Ana Carolina Correia Laurindo de Cerqueira Neto, Augusto Rodrigues Lima, Ariane Salustiano Marinho, Bruna Alves Taveira Ueno, Bruna Milaré Angelieri, Érika Manuela Asteria Clavijo, Felipe Nogueira Anacleto, Flávia Medeiros Saavedra de Paula e Jaqueline Mafra Lazarri por todo o apoio e dedicação oferecidos.

À todos os colegas que participaram do curso, pelas trocas de experiências e principalmente pela amizade criada durante esses dois anos.

RESUMO

A principal causa da patologia pulpar e perirradicular é a presença de microrganismos dentro do sistema de canais radiculares. Estes microrganismos têm a capacidade de organizarem-se na forma de biofilme em diferentes superfícies, em tecidos duros e moles. O biofilme por sua vez, pode ser formado em regiões de difícil acesso para os procedimentos de limpeza realizados durante o tratamento endodôntico. A eliminação de bactérias do biofilme aderentes à superfície é necessária para o reparo dos tecidos periapicais e para a manutenção do dente em condições saudáveis na cavidade oral. Dessa forma, para o estudo de seu desenvolvimento e formas de tratamento, várias técnicas de criação *in vitro* e métodos de análise do biofilme tem sido desenvolvidas. Diferentes agentes antimicrobianos, como substâncias químicas auxiliares e irrigantes; diversas técnicas de instrumentação, agitação ultrassônica e medicação intracanal; tem sido empregados na descontaminação de sistemas de canais radiculares infectados. Muitas destas estratégias antimicrobianas mostraram consideráveis efeitos inibitórios sobre a maioria dos tipos de biofilme microbiano *in vitro*. O objetivo desse trabalho é revisar o panorama do biofilme na infecção endodôntica, compreendendo sua definição, formação, diversidade, localização, mecanismos de resistências, técnicas de estudo *in vitro* e formas de tratamento.

Palavras-chave: Endodontia, bactérias, biofilmes.

ABSTRACT

The main cause of pulpal and periradicular pathology is the presence of microorganisms within the root canal system. Such microorganisms have the ability to organize themselves in the form of biofilms on different surfaces, in hard and soft tissues. The biofilm, in turn, can be formed in regions of difficult access for cleaning procedures during endodontic treatment. The elimination of biofilm bacteria adhered to the surface is necessary for tissue healing and for maintaining the tooth under healthy conditions in the oral cavity. Thus, for the study of its formation and forms of treatment, several *in vitro* breeding techniques and methods of biofilm analysis were developed. Different antimicrobial agents; chemical auxiliary substances and irrigating solutions, instrumentation techniques, ultrasonic agitation and intracanal medication have been used in the management of infected root canal systems. Many of these antimicrobial strategies show considerable inhibitory effects in most types of microbial biofilms formed *in vitro*. The objective of this work was to review the biofilm panorama in endodontic infection, including its definition, formation, diversity, location, mechanisms of resistance, *in vitro* study techniques and treatment modalities.

Keywords: Endodontics, bacterias, biofilms.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 PROPOSIÇÃO	13
3 REVISÃO DA LITERATURA	14
3.1 Definição de biofilme	14
3.2 O desenvolvimento do biofilme	15
3.3 Biofilme endodôntico	15
3.3.1 A diversidade microbiana no biofilme endodôntico	16
3.3.2 Classificação de acordo com a localização	17
3.3.2.1 Biofilme microbiano intracanal	17
3.3.2.2 Biofilme extra-radicular	18
3.3.2.3 Biofilme periapical	19
3.3.2.4 Biofilme formado em corpo estranho	20
3.3.3 Papel do <i>Enterococcus faecalis</i> no biofilme endodôntico	21
3.3.4 Biofilme multi-espécies	22
3.4 Mecanismos de resistência antimicrobiana dos biofilmes	23
3.5 Modelos de formação do biofilme <i>in vitro</i>	24
3.6 Técnicas para análise do biofilme	26
3.7 Tratamento do biofilme endodôntico	29
3.7.1 Efeitos das substâncias químicas auxiliares e irrigantes	29
3.7.2 Efeito da instrumentação no biofilme	31

3.7.3 Efeito da agitação ultrassônica no biofilme	32
3.7.4 Efeito da medicação intracanal no biofilme	33
4 DISCUSSÃO	35
5 CONCLUSÃO	39
REFERÊNCIAS	40

1 INTRODUÇÃO

A reprodução em biofilmes é vantajosa para os microrganismos, pois formam comunidades tridimensionais com canais de transporte de fluidos, como substrato; resíduos e moléculas de sinalização (Usha et al., 2010). Essas comunidades estão ligadas a uma superfície e incorporadas em uma matriz de polissacarídeos e proteínas, formando uma camada viscosa (Portentier et al., 2003). As características dos biofilmes dependem da espécie bacteriana residente, composição e estrutura da superfície ou substrato. A água constitui 80% dos biofilmes orais, enquanto que as frações orgânicas e inorgânicas formam aproximadamente 20% da estrutura do biofilme (Ingle et al., 2008).

A presença de microrganismos nos sistema de canais radiculares é a principal causa da patologia pulpar e perirradicular. Algumas espécies têm a capacidade de organizarem-se na forma de biofilme em diferentes superfícies, em tecidos duros e moles. O biofilme por sua vez, pode ser formado em regiões de difícil acesso para os procedimentos de limpeza realizados durante o tratamento endodôntico. Sua remoção ou máxima redução é primordial para a manutenção do dente em condições saudáveis na cavidade oral, e representa um desafio no tratamento dos canais radiculares. A falha no controle do biofilme pode levar ao insucesso endodôntico (Ricucci e Siqueira, 2010).

As bactérias podem formar biofilmes em superfícies que contenham fluido rico em nutrientes. Dessa forma, três componentes são necessários para o surgimento do biofilme: células bacterianas; uma superfície e um meio fluído. Na região intra-radicular supõe-se que a formação do biofilme ocorra após a primeira invasão da câmara pulpar por bactérias planctônicas, que causam o colapso do tecido pulpar (Costerton et al., 1987; Svensäter e Bergenholz, 2004).

As espécies mais representativas encontradas nas infecções endodônticas, geralmente fazem parte de mais de 13 filos, sendo os mais prevalentes: Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Fusobacteria, Proteobacteria, Spirochaetes e Synergistes. (Munson et al., 2002; Siqueira e Rôças, 2005; Saito et al., 2006; Gomes et al., 2015). Além de bactérias, archaea e fungos tem sido ocasionalmente encontrados nas infecções intra-radiculares (Waltimo et al., 1997; Siqueira et al., 2002; Vianna et al., 2006).

Na endodontia o biofilme pode ser classificado de acordo com a sua localização: biofilme intracanal, biofilme extra-radicular, biofilme periapical e infecção em corpo estranho. O biofilme microbiano intracanal é formado na dentina do canal radicular do dente infectado. Nair (1987) e Sen et al., (1995), observaram por microscopia eletrônica de varredura, camadas finas a espessas de condensações bacterianas e matriz extracelular de origem bacteriana aderindo as paredes dos canais radiculares. Os biofilmes extra-radiculares são formados na superfície radicular externa adjacente ao ápice radicular de dentes infectados e são geralmente associados a dentes com periodontite apical (Leonardo et al., 2002; Frank e Barbour, 2006). Mesmo em dentes aparentemente bem tratados, a periodontite apical pode ser encontrada, provavelmente devido à presença de um biofilme bacteriano misto na região periapical que está em íntimo contato com o hospedeiro (Siqueira et al., 2016). Por fim, na doença periapical recorrente, os microrganismos, além de aderidos à estruturas dentárias, podem formar biofilme na superfície de um biomaterial artificial como a guta-percha (Wilson et al., 1996).

Dentre as espécies mais prevalentes em infecções endodônticas *Enterococcus faecalis*, é a mais estudada por sua capacidade de formar biofilmes (Duggan e Sedgley, 2007; Al-Ahmad et al., 2009). *E. faecalis* pode sobreviver à prolongados períodos com quantidades ínfimas de nutrientes (Figdor et al., 2003). Ademais, ele pode crescer em mono-cultura em canais radiculares já preenchidos na ausência de suporte sinérgico de outra bactéria (Fabricius et al., 1982), sendo uma das bactérias mais detectadas em casos de retratamento (Sundqvist et al., 1998; Peciulienė et al., 2001; Pinheiro et al., 2003; Gomes et al., 2004; Rôças et al., 2004; Siqueira e Rôças, 2004; Willians et al., 2006; Ozbek et al., 2009; Subramanian e Mickel, 2009; Barbosa-Ribeiro et al., 2016).

Além disso, associações bacterianas podem ser importantes, pois, agindo sinergicamente e aumentando sua virulência agravam os danos causados ao hospedeiro (Gomes et al., 1994b). Biofilmes de várias espécies associadas tem sido descritos em estudos anteriores, como os de Chávez de Paz et al. (2015) e Gao et al. (2016).

Para o estudo da formação do biofilme microbiano e formas tratamento, várias técnicas de criação de biofilme *in vitro* foram desenvolvidas, dentre elas: o uso de membranas de nitrato celulose sobre placas de ágar com sangue de ovelha desfibrinadas a 5% (Sena et al., 2006); uso de placas de poliestireno com 96 poços associadas ao uso de um meio de cultura como o caldo de soja tríptico (Mohamed et al., 2004); uso de canais radiculares humanos como substrato, juntamente com meio de cultura e inóculo de espécies bacterianas (Estrela et al.,

2009); uso de diferentes substratos (dentina bovina, guta-percha, hidroxiapatita e osso bovino) e uma cepa padrão de *E. faecalis* (Guerreiro-Tanomaru et al., 2013), entre outras.

Com o intuito de evidenciar as características do biofilme, como: o número e o tipo de microrganismos; vitalidade (células vivas / mortas) da população microbiana residente; idade; espessura (monocamada ou multicamada); estrutura (homogênea, irregular, densa, porosa); e topografia de superfície (picos e vales), dispomos de técnicas de análise colorimétricas e técnicas variadas de microscopia (Kishen e Haapasalo, 2010).

Soluções/substâncias antimicrobianas usadas localmente e medicamentos intracanaís desempenham um papel chave na erradicação dos microrganismos. O hipoclorito de sódio é uma solução química auxiliar frequentemente usada na endodontia devido à sua capacidade de dissolver o tecido necrótico, bem como pela sua potente ação antimicrobiana (Arias-Moliz et al., 2009). A clorexidina (CHX) também é amplamente utilizada na erradicação do biofilme. Essa substância química tem a propriedade da substantividade e é capaz de inibir a adesão de certas bactérias à dentina radicular (Gomes et al., 2013). Também podemos citar os agentes quelantes, como o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), que são usados para remover a camada de smear layer produzida durante a instrumentação mecânica (Chávez de Paz et al., 2010).

Além do uso de soluções irrigadoras e das diversas técnicas de instrumentação, dispositivos de irrigação desempenham um papel importante na remoção de detritos em toda a extensão do canal radicular. As formas de irrigação ultrassônica passiva ou ativa, têm se mostrado eficazes na complementação da descontaminação radicular, aumentando inclusive a ação antimicrobiana dos agentes irrigantes.

Reconhecida a importância do biofilme microbiano nas patologias pulpares e periapicais, este estudo tem como objetivo, por meio de uma revisão de literatura, explicar um panorama do biofilme da endodontia.

2 PROPOSIÇÃO

Objetivo principal:

Este trabalho tem como objetivo evidenciar a influência do biofilme na endodontia, através do levantamento de uma revisão da literatura.

Objetivos específicos:

1. Revelar a importância de seu conhecimento em termos de definição, formação, diversidade, localização e mecanismo de resistência.
2. Apresentar os modelos de desenvolvimento de biofilme *in vitro* e suas possíveis técnicas de análise.
3. Elucidar os efeitos do tratamento endodôntico sobre o biofilme.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 DEFINIÇÃO DE BIOFILME

O biofilme pode ser definido como uma comunidade microbiana séssil, caracterizada por células que estão aderidas tanto a um substrato quanto umas às outras, e envolvidas em uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares (EPS, geralmente um polissacárido) (Siqueira e Rôças, 2008).

Quando totalmente desenvolvido, sua estrutura básica, microcolônias ou aglomerado de células, é composto por células bacterianas aderentes de superfície. Sendo constituído por uma matriz formada por proteínas, polissacarídeos, ácidos nucléicos, e sal, o que forma mais de 85% do volume, enquanto os outros 15% são células. Conforme o biofilme vai ficando maduro, sua estrutura e composição mudam de acordo com as condições ambientais (condições de crescimento; natureza do movimento de fluidos; propriedades físico-químicas do substrato; disponibilidade nutricional; etc). Os canais de água são reportados como um sistema circulatório primitivo no biofilme (Donlan e Costerton, 2002).

As substâncias orgânicas que permeiam os microrganismos de um biofilme são principalmente carboidratos, proteínas e lipídeos. Entre os elementos inorgânicos estão: o cálcio; fósforo; magnésio e flúor (Tronstad e Sunde, 2003).

Quanto à capacidade de sobreviver em condições ambientais que dificultam o crescimento, algumas vantagens são relacionadas ao desenvolvimento bacteriano em biofilmes, como: a capacidade de auto-organização; a resistência a perturbações ambientais e o sinergismo (Caldwell et al., 1997).

Essas habilidades podem ser explicadas pela cooperação, com troca de nutrientes e metabólitos, entre as células residentes de uma mesma espécie ou de espécies diferentes dentro da estrutura do biofilme. Além da presença de uma compartimentalização interna que ajuda as espécies com requerimentos distintos de crescimento. Ademais, a comunicação e a troca de material genético podem fazer com que as células bacterianas adquiram novas peculiaridades (Lewis, 2001).

3.2 O DESENVOLVIMENTO DO BIOFILME

De acordo com a revisão de literatura de Jhajharia e colaboradores (2015), o biofilme se desenvolve em três estágios.

No primeiro ocorre a formação de uma camada de condicionamento, com a absorção de moléculas orgânicas e inorgânicas à uma superfície. Na formação da placa dental, por exemplo, a superfície do dente é condicionada pela película da saliva, dando origem a chamada película adquirida.

Na segunda fase tem-se a adesão das células bacterianas à camada de condicionamento. Assim, natureza da interação entre as bactérias e o substrato será determinada pelas propriedades físico químicas como energia de superfície e densidade de carga. Destarte, pontes entre os microrganismos e o filme condicionante serão formadas por estruturas bacterianas, como: fibrilas; pili; flagelos e EPS (glicocalix).

Por fim, no terceiro estágio acontece o crescimento bacteriano e a expansão do biofilme. E assim, microcolônias são formadas em camadas de microrganismos que atraem colonizadores secundários para essa comunidade metabolicamente ativa, em que as células bacterianas dividem tarefas e benefícios.

3.3 BIOFILME ENDODÔNTICO

Primeiramente, há a penetração do microrganismo na polpa, seguida por sua adesão e difusão ao longo do canal. Possivelmente, é depois da formação do biofilme que o processo infeccioso ganha força suficiente para causar a subsequente destruição do tecido pulpar. Em seguida, a progressão do biofilme no sistema de canais radiculares pode caminhar para a saída no forame, internamente ou na superfície externa da raiz, e daí para o ambiente do tecido periapical (Tronstad et al., 1990; Leonardo et al., 2002). Em alguns casos foram observados microrganismos aderidos à lesões periapicais (Tronstad et al., 1987).

Com a progressão da infecção endodôntica o ambiente e a disposição de nutrientes no canal radicular muda para uma condição mais anaeróbia e com restrição nutritiva, gerando a seleção dos microrganismos sobreviventes.

3.3.1 A diversidade microbiana no biofilme endodôntico

Atualmente, mais de 1.000 espécies bacterianas pertencentes a 13 filotipos já foram identificadas na microbiota da cavidade oral. Tais bactérias são capazes de atingir o sistema de canais radiculares e tornarem-se potenciais patógenos endodônticos (Marsh, 2003; Usha et al., 2010).

Ainda que a microbiota relatada na infecção primária envolva várias espécies, em infecções secundárias persistentes, provenientes do insucesso endodôntico, há uma variedade menor de microrganismos. Siqueira e Rôças (2005) apontam que há usualmente um número restrito de espécies relacionadas à infecções endodônticas de forma geral, isso devido às limitações dos métodos dependentes da cultura, uma vez que aproximadamente 50% da microbiota oral ainda é incultivável. Assim, o papel de microrganismos mais exigentes ou ainda incultiváveis na patogênese e sintomatologia de infecções endodônticas primárias ou lesões perirradiculares persistentes pode ter sido subestimado (Kakehashi et al., 1965; Fabricius et al., 1982; Donlan, 2002).

Os métodos moleculares de identificação bacteriana baseados no sequenciamento de rRNA 16S representam uma ferramenta importante para a identificação de patógenos cultiváveis e incultiváveis e a determinação de sua posição taxonômica. Por meio desses métodos: 486 patógenos foram encontradas em infecções endodônticas agudas; 265 em infecções crônicas e 165 em ambos os casos (Nobrega et al., 2016).

As bactérias endodônticas pertencem a mais de 13 filos, com as espécies mais representativas pertencendo aos filos: Firmicutes; Bacteroidetes; Actinobacteria; Fusobacteria; Proteobacteria; Spirochaetes e Synergistes. (Munson et al., 2002; Siqueira e Rôças, 2005; Saito et al., 2006; Gomes et al., 2015).

Além de bactérias, outros microrganismos podem ser encontrados nas infecções endodônticas. Archaea e fungos têm sido ocasionalmente encontrados em infecções intra-

radiculares (Waltimo et al., 1997; Siqueira et al., 2002; Vianna et al., 2006). Contudo, os últimos são mais prevalente em dentes tratados com doença pós-tratamento (Siqueira e Sen, 2004).

3.3.2 Classificação de acordo com a localização

O biofilme pode estar localizado na porção interna ou externa da raiz, normalmente na porção final do canal radicular, contudo, este pode ser encontrado inclusive em biomateriais que ultrapassaram o limite apical. De acordo com sua localização o biofilme pode ser classificado em: biofilme intracanal; biofilme extra-radicular; biofilme periapical e infecção em corpo estranho (biomateriais) (Jhajharia et al., 2015).

3.3.2.1 Biofilme microbiano intracanal

Os biofilmes intracanais são biofilmes microbianos formados na dentina do canal radicular do dente infectado. A identificação do biofilme formado foi previamente reportada por Nair em 1987, sob microscopia eletrônica de transmissão, em que foi examinado o conteúdo do canal radicular de dentes com cárie e observou-se que a maior parte dos organismos, dentre eles cocos; hastes; filamentos e espiroquetas, existiam em forma planctônica. Entretanto, agregados densos também foram observados aderindo às paredes do canal e formando desde camadas finas até espessas de condensações bacterianas e matriz extracelular de origem bacteriana. Essas condensações bacterianas mostraram uma estrutura de paliçada similar à da placa dentária nas superfícies dentais externas, sugerindo mecanismos similares para a fixação bacteriana como os da placa dentária (Nair, 1987).

Da mesma forma, Sen e colaboradores (1995) investigaram as paredes do canal radicular dos dentes infectados por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e constataram que as bactérias formaram colônias densas nas paredes do canal, bem como na dentina tubular. Além das bactérias, os fungos eram capazes de formar colônias densas, mas separadas por toda a parede do canal radicular.

O biofilme intracanal além de ocupar o canal principal também pode estar localizado em canais laterais, Ricucci et al. (2013), em um estudo de caso, notaram que a causa do insucesso endodôntico do dente em questão tratado, por cirurgia parendodôntica, foi uma exuberante colonização por biofilme bacteriano de um canal lateral localizado na região apical. Os autores puderam concluir, através do estudo histo-bacteriológico da porção final do canal radicular, que o conteúdo dos canais laterais geralmente não são alcançados pelos procedimentos químicos e mecânicos de limpeza empregados, o que representa um desafio ao tratamento no que tange a limpeza dessas áreas dos canais radiculares.

3.3.2.2 Biofilme extra-radicular

Os biofilmes extra-radiculares são formados na superfície radicular externa adjacente ao ápice radicular de dentes infectados (Frank e Barbour, 2006). Em um estudo de casos, Tronstad et al. (1990) examinaram a região apical de dentes extraídos cirurgicamente sob MEV e encontraram biofilme regular sem estrutura, com bactérias de diferentes espécies e graus variáveis de matriz extracelular. Ham et al. (1998) e Ricucci et al. (2005) tiveram conclusões próximas ao demonstrarem a presença de depósitos de biofilmes semelhantes à cálculos na ponta da raiz dos dentes com periodontite apical secundária.

Pelo uso do MEV como ferramenta de estudo, Lomcali et al. (1996) exploraram as superfícies radiculares apicais dos dentes com periodontite apical crônica. Os resultados mostraram bactérias e células de levedura em forma de placa bacteriana periapical com uma estrutura lisa, presente principalmente ao redor do forame apical principal. Esta placa multicamada tinha microrganismos incorporados numa matriz extracelular e eram revestidos com uma estrutura lisa, sendo este revestimento uma combinação de subprodutos bacterianos e componentes inflamatórios locais.

Utilizando SEM, Leonardo et al. (2002) avaliaram as pontas radiculares de dentes extraídos com várias condições pulpares, incluindo polpas vitais ou necróticas, estas com ou sem lesões apicais. Eles observaram que a formação de biofilme estava presente apenas em dentes com periodontite apical. Em outro estudo, verificou-se que a presença de lesões periapicais crônicas causaram alterações severas na estrutura apical com diferentes graus de

reabsorção do cimento, formando lacunas nas quais o biofilme bacteriano foi encontrado (Rocha et al., 2008).

Com relação a microbiota *Fusobacterium nucleatum*; *Porphyromonas gingivalis*; and *Tannerella forsythia* foram encontrados, utilizando-se a reação em cadeia de polimerase (PCR) do 16S rRNA por Conrads et al., em 1997, em associação com o biofilme extra-radicular.

Contudo, Medvedev et al., 2006 verificou que as lesões periapicais geralmente estão associadas com espécies de *Actinomyces* e *Propionibacterium propionicum*, podendo ocorrer quando as bactérias presentes em tais biofilmes superam os mecanismos de defesa do hospedeiro. A agregação de células de *Actinomyces* é influenciada pelo pH; força iônica; e concentração celular, que facilita a formação de biofilmes. Esta condição consiste no estabelecimento de microrganismos nos tecidos periapicais pela sua aderência tanto à superfície radicular apical, na forma de estruturas semelhantes a biofilmes, quanto no interior do corpo da lesão inflamatória, geralmente como colônias coesivas (Tronstad et al., 1990).

Figdor e Davies (1997) investigaram a estrutura de *Actinomyces israelii* por microscopia eletrônica e relataram que as cepas podem ter fímbrias semelhantes a pêlos que sobressaem através de um revestimento superficial espesso. Eles sugerem que tanto a fímbrias quanto as estruturas e a matriz do revestimento exterior em torno das bactérias, podem ajudar as células na agregação em colônias coesas de filamentos emaranhados. Além disso, demonstraram que as estirpes associadas à doença pós-tratamento crescem como filamentos entrelaçados, formando grânulos dentro dos tecidos hospedeiros. Por fim, concluíram que a capacidade de formar microcolônias filamentosas ramificadas pode ser fundamental para o estabelecimento destas bactérias no tecido.

3.3.2.3 Biofilme periapical

Mesmo na ausência de contaminação do canal radicular, biofilmes periapicais microbianos isolados na região periapical de dentes infectados podem ser vistos. Tais biofilmes apicais são de difícil remoção com o uso do preparo químico-mecânico, pois são resistentes aos agentes antimicrobianos. Vários estudos tem mostrado a presença de hastes, cocos, bacilos e

espiroquetas na superfície das raízes em casos de periodontite refratária (Tronstad et al., 1990; Lomçali et a., 1996).

Em 2016, Siqueira e colaboradores avaliaram o microbioma da porção apical do sistema de canais radiculares de dentes aparentemente bem tratados com periodontite apical pós-tratamento e notaram comunidades bacterianas mistas com alta diversidade bacteriana. Representantes de 11 filamentos bacterianos foram identificados no sistema de canais radiculares apicais. Os filos mais diversos e abundantes foram Proteobacteria; Firmicutes; Fusobacteria; e Actinobacteria. Os membros do primeiro grupo dominaram 60% dos casos. Destarte, os autores concluíram que o estudo da região apical é de suma importância, pois mesmo dentes bem tratados podem apresentar lesão periapical, provavelmente devido a presença de uma comunidade bacteriana mista na região apical, que está em íntimo contato com o hospedeiro, induzindo à danos e à manutenção da inflação periapical.

3.3.2.4 Biofilme formado em corpo estranho

O biofilme formado no corpo estranho é encontrado quando as bactérias aderem a uma superfície de biomaterial artificial e formam estruturas de biofilme (Wilson et al., 1996). Takemura et al. (2004) relataram que os anaeróbios facultativos Gram-positivos colonizam e formam a matriz polimérica extracelular que envolve a guta-percha. Estudos sugeriram que o biofilme microbiano extra-radicular e o biofilme formado em corpo estranho estão relacionados à doença periapical refratária.

Na endodontia, o biofilme no material da obturação do canal radicular pode ser intra-radicular ou extra-radicular, o que depende de como os materiais obturadores estão dentro do espaço do canal radicular ou se foram estruídos além do ápice.

As espécies de bactérias como *E. faecalis*; *Streptococcus sanguinis*; *Streptococcus intermedius*; *Streptococcus pyogenes*; e *Staphylococcus aureus* formam biofilme em guta-percha. Já *Fusobacterium nucleatum*; *Propionibacterium acnés*; *Porphyromona gingivalis*; e *Prevotella intermedia* não formam biofilme na guta-percha (Jhaharia et al., 2015).

Noiri et al. (2002) analisaram a presença de formação de biofilme nas pontas radiculares dos dentes extraídos com "lesão periapical refratária" e os cones de guta-percha removidos durante o tratamento endodôntico por SEM. Os cones de guta-percha que se estendiam pelo ápice estavam quase completamente cobertos com estruturas semelhantes a glico-cálvulas. Bactérias, principalmente filamentos ou hastes longas, foram vistas nas superfícies radiculares externas nos dentes extraídos.

3.3.3 Papel do *Enterococcus faecalis* no biofilme endodôntico

Entre diferentes isolados bacterianos clínicos recuperados de infecções endodônticas, *E. faecalis* é a espécie que tem sido mais estudada por sua capacidade de formar biofilmes (Duggan e Sedgley, 2007; Al-Ahmad et al., 2009). Além disso, independente da técnica de identificação utilizada (dependentes ou independentes de cultura) *E. faecalis*, uma bactéria Gram-positiva facultativa anaeróbia, é um dos micro-organismos mais detectados em casos de retratamento (Sundqvist et al., 1998; Peciuliene et al., 2001; Rôças et al., 2004; Siqueira e Rôças, 2004; Willians et al., 2006; Ozbek et al., 2009; Subramanian e Mickel, 2009; Barbosa-Ribeiro et al., 2016), sendo capazes de suportar condições severas de sobrevivência no canal radicular com grande variação de pH, temperatura e tensão de O₂ (Gomes et al., 2008; Baik et al., 2011; Lee e Baek 2012). Quando expostas ao estresse ambiental, algumas cepas podem adotar um estado viável mas não cultivável e ressuscitar quando as condições normais são restabelecidas (Lleò et al., 2001). *E. faecalis* pode sobreviver à prolongados períodos com quantidades ínfimas de nutrientes (Figdor et al., 2003). Ademais ele pode crescer em monocultura em canais radiculares já preenchidos, na ausência de suporte sinérgico de outra bactéria (Fabricius et al., 1982).

Ainda em relação a resistência desse microrganismo ao tratamento endodôntico, Distel et al. (2002) verificaram que as culturas puras de *E. faecalis* inoculadas em canais radiculares, medicados ou não com hidróxido de cálcio, foram capazes de formar uma estrutura de biofilme nas paredes do canal. Nair et al. (2005) descobriram que mesmo após a instrumentação, irrigação e obturação em um tratamento de uma visita, os microrganismos existiam como biofilmes em locais intocados no canal principal, istmo e canais acessórios em 87,5% dos dentes endodonticamente tratados.

Contudo, as propriedades físico-químicas do biofilme de *E. faecalis* parecem mudar de acordo com o ambiente existente e condições nutricionais. *E. faecalis* sob condições de privação de nutrientes (ambientes aeróbios e anaeróbios), apresentam o crescimento irregular de aglomerados, células bacterianas mortas e bolsos de células bacterianas viáveis na estrutura do biofilme (Distel et al., 2002). Em ambientes ricos em nutrientes produzem típicas estruturas de biofilme, com superfícies de agregação de células bacterianas e canais de água específicos. Células bacterianas viáveis estão presentes na superfície do biofilme (Mohamed et al., 2004), tal fato pode ser atribuído em parte aos traços de virulência específicos, como produção de gelatinase e presença do determinante da aderência; esta combinação foi mostrada para ser associada com a formação de biofilmes mais espessos (Mohamed e Murray, 2005). Estas características de virulência têm sido identificadas em isolados clínicos de *E. faecalis* de infecções endodônticas assintomáticas, persistentes nos canais radiculares e na cavidade oral (Sedgley et al., 2006).

Vários mecanismos de sobrevivência do *E. faecalis* estão descritos na literatura, como sua capacidade de aderir e infiltrar células epiteliais (Guzman et al., 1989; Mohamed et al. 2004); e capacidade de formar biofilmes persistentes associados a infecção refratária (Kishen et al., 2006). Subramanian e Mickel (2009) reforçaram tais achados, afirmando que o *E. faecalis* pode contribuir na persistência das infecções periapicais pela formação de biofilmes, assim como pela adesão e invasão de tecidos moles.

George et al. (2005) avaliaram a habilidade de *E. faecalis* desenvolver biofilme em condições aeróbias, anaeróbias, ricas em nutrientes e carentes de nutrientes. De acordo com suas descobertas, quando as células de *E. faecalis* foram cultivadas em condições aeróbias ricas em nutrientes, elas produziram macroestruturas amorfas de forma irregular de 500-1000 µm de dimensão, estas estruturas eram agregados de células bacterianas. Os espécimes de *E. faecalis* mantidos sob condições anaeróbias ricas em nutrientes mostraram biofilme maduro com canais de água aparentes na parede do canal radicular, quando examinados por MEV e microscópio confocal de varredura a laser (CLSM). Já no exame de biofilmes formados em ambientes aeróbios desprovidos de nutrientes não haviam agregados de células bacterianas intactas formadas na superfície destas estruturas, em contraste com aquelas em condições ricas em nutrientes.

3.3.4 Biofilme multiespécies

Os biofilmes de várias espécies, presentes nos canais radiculares, foram descritos em estudos anteriores. Do ponto de vista ecológico, os microrganismos mantêm um equilíbrio na microbiota. Além disso, o desenvolvimento da patologia endodôntica é dependente de associações entre as espécies. Sendo assim, associações bacterianas podem ser importantes, pois agindo sinergicamente e aumentando sua virulência agravam os danos causados ao hospedeiro (Gomes et al., 1994b).

Gao et al. (2016) mostraram, em um modelo de biofilme dos canais radiculares, que *E. faecalis* formou uma estrutura densa de biofilme na dentina do canal radicular na presença de *S. gordonii* e *A. viscosus*.

Os resultados de Chávez de Paz et al (2015) mostraram que *E. faecalis* pode inibir *Actinomyces naeslundii* utilizando câmaras miniflow e filtro de 16S ribossomal RNA *in situ* de hibridação. *A. viscosus* e *A. naeslundii* pertencem à mesma espécie e podem ter propriedades semelhantes. Embora *S. gordonii* e *A. viscosus* possam promover o crescimento de *E. faecalis*, não foi observado biofilme denso na dentina do canal radicular em um modelo de 5 espécies. Sob condições de inanição, *S. gordonii* foi completamente inibido por *E. faecalis*, mas *A. viscosus* mostrou melhor sobrevivência sob inatividade em coexistência com *E. faecalis* do que sozinho, em contraste com a nutrição abundante na qual *A. naeslundii* ou *A. viscosus* foram inibidos. *E. faecalis* foi mais resistente à inanição em coexistência com *S. gordonii* e *A. viscosus* do que sozinho. Essas interações interespecíficas podem ser uma das razões pela qual *E. faecalis* frequentemente é dominante em canais previamente tratados e preenchidos.

3.4 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DOS BIOFILMES

Existem vários mecanismos para que os biofilmes resistam aos agentes antimicrobianos, como sua matriz polissacarídica que pode retardar a difusão dos antibióticos. Além disso, as enzimas extracelulares, tais como a β -lactamase, podem ficar aprisionadas e concentradas na matriz, inativando assim os antibióticos β -lactâmicos (Dunavant et al., 2006).

Ademais, a comunicação entre as células pode influenciar a estrutura do biofilme, estimulando o crescimento de espécies benéficas para o mesmo (Larsen et al., 2002).

Foi demonstrado que subpopulações de bactérias em um biofilme formam um estado fenotípico onde elas são altamente protegidas. As células bacterianas protegem-se por estarem localizadas dentro da parte interior de um biofilme. Portanto, os medicamentos só atuarão sobre os microrganismos na porção periférica do biofilme. A depleção de nutrientes ou o acúmulo de produtos residuais pode resultar na entrada de bactérias em um estado não-crescente que protege as bactérias dos antibióticos (Portenier et al., 2003). Pajkos et al. (2004) revelaram que as bactérias do biofilme existem em baixo estado metabólico, com uma taxa de crescimento mais lenta e produção de exopolissacarídeos.

Outro mecanismo é a troca genética dentro do biofilme, via transferência horizontal de genes, que conduzem a uma disseminação de genes de resistência a antibióticos entre diferentes espécies clinicamente relevantes. De acordo com Madson et al. (2012) as taxas de transferência de genes horizontais são tipicamente mais altas nas comunidades de biofilme, em comparação com as de nichos planctônicos. Assim, existe uma ligação entre a formação de biofilmes e a transferência genética horizontal.

Ademais, a persistência de bactérias endodônticas através da formação de biofilmes sublinha a necessidade de métodos mais eficazes para eliminar completamente ou reduzir drasticamente as bactérias durante o tratamento endodôntico. Deve-se também ter em mente que a complexa anatomia do canal radicular apresenta outras dificuldades, visto que os biofilmes de microrganismos persistentes dentro dos canais radiculares também podem estar localizados nas paredes das ramificações e istmos.

3.5 MODELOS DE FORMAÇÃO DO BIOFILME *IN VITRO*

Existem várias técnicas para a criação de biofilmes microbianos *in vitro*. Uma delas é a criação de biofilmes em membranas de nitrato celulose (0,2 µm de tamanho de poro, 13 mm de diâmetro). Nesta técnica, as membranas são colocadas sobre a superfície de placas de ágar com sangue de ovelha desfibrinadas a 5% (BHI) (para microrganismos aeróbios e facultativamente anaeróbios) e sobre ágar de anaeróbios fastidiosos (FAA) e são ainda

inoculados com 20 µl de cada suspensão de microrganismo de teste. As placas, cada uma contendo filtros de membrana, são incubadas novamente a 37 ° C sob condições gasosas apropriadas: aeróbios e anaeróbios facultativos numa incubadora de CO₂ e anaeróbios numa câmara anaeróbica numa atmosfera de 10% de H₂, 10% de CO₂ e 80% N₂ (Sena et al., 2006).

Outra técnica foi proposta por Mohamed et al., em 2004, resumidamente, para cada cepa estudada, uma colônia foi transferida para caldo de soja tríptico (TSB, Bacto Tryptic Soy Broth, contém 0,25% de glucose, Becton, Dickinson e Co) e incubada durante uma noite sob condições aeróbias estacionárias a 37 °C. As culturas foram diluídas a 1: 100 em meio e 200 µl desta suspensão de células foram distribuídas em placas de microtitulação de 96 poços estéreis de fundo plano (Falcon, Becton, Dickinson e Co, Franklin Lakes, NJ). Quatro poços por cepa foram inoculados. Para os controles negativos, apenas o TSB foi distribuído em oito poços por placa. Após o período incubação estacionária à 37°C por 24 horas, o caldo foi retirado cuidadosamente com uma pipeta multicanal. Os poços foram lavados três vezes com 200 µl de solução salina tamponada com fosfato. Os biofilmes foram fixados com 200 µl de Fixador de Bouin (Ricca Chemical Company, Arlington, TX) durante 30 minutos e os poços foram lavados com água destilada. Os biofilmes foram corados com 200 µl de solução de cristal violeta a 1% em água durante 30 minutos e os poços foram lavados com água destilada. As placas de microtitulação foram invertidas numa toalha de papel e secas ao ar. Para quantificar biofilme, foram adicionados 200 µl de etanol-acetona (80:20, vol / vol) a cada poço. Posteriormente, a densidade óptica do cristal violeta ressolubilizado foi medida a 570 nm (OD₅₇₀) utilizando um leitor de placas de microtitulação (Bio-Tek ELx800, Winooski, VT). Cada ensaio foi realizado em quadruplicado em três ocasiões para um total de 12 leituras para cada cepa. Poços contendo meio não inoculado serviram como controles negativos e para determinar a densidade óptica de fundo.

Estrela et al. (2009) com o objetivo de desenvolver um sistema modelo para o estudo de estratégias antimicrobianas em biofilmes endodônticos, infectaram 10 canais radiculares de dentes humanos in vitro com *Enterococcus faecalis*. Para tal cinco mililitros de BHI foram misturados com 5 ml dos inóculos bacterianos (*E. faecalis*) e inoculados com volume suficiente para preencher o canal radicular durante 60 dias. Este procedimento foi repetido a cada 72 horas, utilizando sempre cultura pura de 24 h preparada e ajustada ao padrão de turbidez MacFarland Nº 1. A formação de biofilmes foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (SEM). *E. faecalis* aderiu consistentemente à estrutura do colágeno da superfície da dentina colonizada, progrediu para os túbulos dentinários e formou um biofilme.

Em 2013, Guerreiro-Tanomaru e colaboradores realizaram um estudo com o objetivo de verificar a formação de biofilme de *E. faecalis* em diferentes substratos. As superfícies utilizadas foram: dentina bovina, guta-percha, hidroxiapatita, e osso bovino. Uma cepa padrão de *E. faecalis* (ATCC 29212) foi utilizada para a formação de biofilmes. Após confirmação da pureza da cepa por coloração de Gram e morfologia das colônias, as células foram cultivadas em 4,0 ml de caldo de BHI (Difco, Detroit, MI) durante a noite, à 37 °C. A densidade celular foi de $3,2 \times 10^7$ unidades formadoras de colônia por mililitro. Todas as amostras de substrato tinham uma das superfícies identificadas com um lápis. A superfície marcada foi colocada na direção da superfície da placa, e o outro lado foi utilizado para o crescimento do biofilme. As amostras de substrato foram colocadas em placas de cultura de 24 poços. Cada poço continha 1,8 ml de meio BHI estéril e 0,2 ml de inóculo, em que as amostras foram mantidas submersas. As placas de cultura foram colocadas em câmara de cultura anaeróbia e mantidas em estufa (modelo Q816M20, Quimis Aparelhos Científicos Ltda, Diadema, SP, Brasil) à 37° C por 14 ou 21 dias sob agitação. Para prevenir a deficiência de nutrientes, o meio de cultura BHI foi completamente substituído a cada 48 horas, sem adição de novos microrganismos.

3.6 TÉCNICAS PARA ANÁLISE DO BIOFILME

As características dos biofilmes, como o número e tipo de microrganismos; vitalidade (células vivas / mortas) da população microbiana residente; idade; espessura (monocamada ou multicamada); estrutura (homogênea, irregular, densa, porosa); e topografia de superfície (picos e vales), podem ser caracterizados por ensaios de biofilme que envolvem diferentes técnicas, como técnicas colorimétricas e técnicas de microscopia (Kishen e Haapasalo, 2010).

Com relação a técnica colorimétrica, temos o trabalho de Stepanovic e colaboradores, em 2000, que desenvolveram uma técnica de leitura de placa modificada para a quantificação da formação de biofilme. Esta técnica envolvia a fixação do biofilme bacteriano com metanol, coloração com violeta cristal, libertação do corante ligado com 33% de ácido acético glacial e medição da densidade ótica (DO) da solução a 570 nm utilizando um leitor de ensaio imunoenzimático.

Medeiros et al. (2014), 14 anos após, utilizaram a técnica de Stepanovic et al. (2000) com algumas melhorias. Resumidamente, as bactérias foram cultivadas a 36 °C em caldo de soja tríptico (TSB) durante 18 h. Os poços estéreis de microplacas de poliestireno de 96 poços foram cheios com 180 µL de TSB suplementado com glucose a 0,75% (TSBG) e 20 µL de suspensão bacteriana contendo aproximadamente 10⁸ ufc / ml. Subsequentemente, as placas foram incubadas durante 18h a 36 °C. Em seguida, essas foram coradas com cristal violeta e lavadas. A densidade óptica (O.D.) foi medida a 492 nm (O.D.492) em espectrofotômetro (Anthos 2010 Microplates Reader). Os autores notaram que quase todas as bactérias isoladas em sua pesquisa foram capazes de formar biofilme *in vitro* pela técnica de adesão em placa de poliestireno.

No campo da microscopia, Gao et al. (2016), avaliaram *in vitro*, por microscopia eletrônica de varredura (SEM), as infecções do canal radicular com biofilme de dupla espécie e de um grupo com múltiplas espécies. Os grupos eram constituídos da mistura de 5 bactérias (*E. faecalis*, *C. albicans*, *S. gordonii*, *A. viscosus* e *L. acidophilus*) e foram inoculados em placas de 12 poços (Corning Costar, Corning, NY) contendo 3 ml de caldo BHI, e a concentração final de cada bactéria foi de 10⁵ ufc / ml. Após os devidos procedimentos para a formação do biofilme, os espécimes foram preparados para microscopia eletrônica de varredura (E-1010, Hitachi, Ibaraki, Japão) por fixação em 2,5% de glutaraldeído e desidratação em uma série de soluções de acetonitrilo (50%, 70%, 80% e 90% 20 minutos cada e 100% durante 20 minutos, duas vezes). Os espécimes foram secos, revestidos com ouro e uma área de biofilme selecionada aleatoriamente foi observada na dentina do canal radicular usando SEM. O método de análise evidenciou que as coculturas de *E. faecalis* e *C. albicans*, *E. faecalis* e *L. acidophilus* mostraram um biofilme relativamente fino na dentina do canal radicular, e os túbulos dentinários ainda eram claramente visualizados. Tanto *E. faecalis* como *C. albicans* foram observados na dentina do canal radicular na cocultura desses dois microrganismos, enquanto na cocultura de *E. faecalis* e *L. acidophilus*, *E. faecalis* dominou a dentina do canal radicular e apenas uma pequena quantidade de *L. acidophilus* foi observada. Na estrutura do biofilme da cocultura de 5 cepas, cocos, bacilos e *Candida* apareceram na dentina do canal radicular. *E. faecalis* e *S. gordonii* e *E. faecalis* e *A. viscosus* formaram um biofilme bastante grosso e denso, e um grande número de cocos cobriram a dentina do canal radicular.

Outra técnica de microscopia é microscopia confocal de varredura à laser (CLSM). Qiu et al. (2016) verificaram a inibição na formação de biofilme do *S. mutans* pelo uso de antifúngico, para tal após a etapa de crescimento dos biofilmes e aplicação dos antifúngicos, os

biofilmes foram corados pelo kit BacLight live / dead (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA) As bactérias vivas foram coradas com SYTO 9, enquanto que as bactérias mortas com membranas comprometidas foram coradas com iodeto de propídio (PI). As imagens de biofilme foram capturadas utilizando um microscópio de varredura confocal a laser Leica DMIRE2 (CLSM, Leica) equipado com um microscópio de 63x (Abertura numérica 1,4) lente de imersão de óleo. As portas de recolha de imagens foram ajustadas para 495-515 nm para SYTO 9 e 655-690 nm para PI. Cada biofilme foi digitalizado em cinco posições escolhidas aleatoriamente. Imagens tridimensionais de biofilmes foram renderizadas pelo software Imaris 7.0 (Bitplane, Suíça). Os dados obtidos pela microscopia confocal, permitiram a conclusão de os dois antifúngicos utilizados inibiram a formação do biofilme de *S. mutans*. Além disso, as proporções de bactérias vivas / mortas foram significativamente menores do que os do grupo controle.

Ainda no estudo de Guerreiro-Tanomaru et al. (2013) após os procedimentos necessários para a formação de biofilme nos diferentes substratos testados, os mesmos foram corados usando o corante Live / dead, e as imagens foram analisadas sob um microscópio confocal. O biovolume total (mm³), biovolume de bactérias vivas (mm³) e cobertura de substrato (%) foram quantificados utilizando o software BioImage_L. Seus resultados revelaram que a formação de biofilmes foi observada em todos os grupos. A guta-percha apresentou o menor biovolume total aos 14 dias ($p < 0,05$) e a hidroxiapatita foi a mais alta aos 21 dias ($p < 0,05$). Não foi observada diferença significativa no biovolume verde (vivo) aos 14 dias. No entanto, aos 21 dias, a hidroxiapatita apresentou o maior volume ($P < 0,05$). Os percentuais de cobertura foram semelhantes entre todos os substratos aos 21 dias ($P > 0,05$), mas aos 14 dias, o osso bovino apresentou a maior cobertura ($P < 0,05$). Dessa forma, puderam concluir que *E. faecalis* foi capaz de formar biofilme em todos os substratos durante ambos os períodos de crescimento e que o tipo de substrato influenciou as características do biofilme.

A microscopia de força atômica (AFM) é mais uma técnica de microscopia, que apresenta vantagens por não requerer o processamento especial de espécimes. Sherestha e Kishen (2014), estudaram a interação entre nanopartículas de quitosana funcionalizadas rosa-bengala (CSRBnps) da terapia fotodinâmica (PDT) com células bacterianas de biofilmes por meio da microscopia de força atômica, que forneceu informações sobre a topografia de superfície em nanoescala. O efeito dos tratamentos sobre a membrana bacteriana foram avaliados utilizando a absorvância de 260 nm. *E. faecalis* (American Type Culture Collection [ATCC] 29212) foi incubado durante a noite a 37 °C sob agitação. A cultura foi centrifugada

(4000 rpm, 10 minutos, 4°C), os sobrenadantes foram rejeitados, e foi lavado duas vezes em água deionizada estéril. As células foram ressuspensas em água deionizada e ajustadas para 10^5 unidades formadoras de colônias / ml (densidade óptica = 0,3) a 600 nm. Alíquotas de suspensão celular (1 ml) foram então centrifugadas. Os sobrenadantes foram rejeitados e os sedimentos celulares foram tratados com CSRBnps a 37 ° C durante 15 minutos e protegidos da luz ambiente. Para PDT, as células fotosensibilizadas foram centrifugadas, e os grânulos de células foram irradiados (5 J/cm², feixe de fibras ópticas de comprimento de onda de 540 nm, 2 minutos). As amostras bacterianas foram fixadas em glutaraldeído a 2% (1 hora, 37 ° C). As células bacterianas tratadas e não tratadas foram espalhadas num vidro limpo e secas ao ar à temperatura ambiente no escuro. As amostras foram fotografadas com um instrumento JPK NanoWizard II (JPK Instruments AG, Berlim, Alemanha). As medições microscópicas de força atômica foram realizadas no modo de contato intermitente no ar usando pontas de cantilever de silício sob condições ambientais. Uma média de 10 células foram fotografada para o efeito de CSRBnps e PDT na morfologia da superfície celular. Mediu-se a cinética de libertação de constituintes citoplasmáticos após lesão da membrana bacteriana utilizando a absorvância do filtrado de células bacterianas a 260 nm (densidade óptica [OD₂₆₀]) através de um espectrofotómetro ultravioleta-visível (Ultra Spec 3000, Pharmacia Biotek, Centerville, VA). A AFM permitiu que as células bacterianas fossem visualizadas sem qualquer preparação de amostra adicional e em uma alta resolução na gama de nanômetros e revelaram que as células bacterianas que ainda não haviam sofrido tratamento tiveram uma superfície celular macia com margens bem definidas. Depois do CSRBnp, as nanopartículas foram encontradas aderidas a superfície das células e a subsequente exposição ao PDT resultou na formação de cavidades na superfície bacteriana e ruptura das células.

3.7 TRATAMENTO DO BIOFILME ENDODÔNTICO

3.7.1 Efeitos das substâncias químicas auxiliares e irrigantes (COLOCAR TRABALHOS MAIS RECENTES) NEILA

O papel de irrigação do canal radicular é ajudar na erradicação de bactérias e na remoção do biofilme bacteriano de superfícies não instrumentadas (Haapasalo et al., 2007). As

soluções antimicrobianas, outros agentes de desinfecção usados localmente, e medicamentos intracanáis desempenham um papel chave na eliminação dos microrganismos. Soluções químicas são frequentemente desenvolvidas e otimizadas para a sua atividade contra populações microbianas (Usha et al., 2010). No entanto, as comunidades microbianas cultivadas em biofilmes são extremamente difíceis de se erradicar com agentes antimicrobianos e os microrganismos em biofilmes maduros podem ser notoriamente persistentes. Há relatos que mostram que os microrganismos cultivados em biofilmes podem ser 1000-1500 vezes mais resistentes aos antimicrobianos do que as bactérias planctônicas (Spratt e Pratten, 2003).

Dentre as soluções químicas auxiliares há o hipoclorito de sódio, que é frequentemente usado na endodontia devido à sua capacidade de dissolver o tecido necrótico, bem como pela sua potente ação antimicrobiana (Arias-Moliz et al., 2009). No entanto, não foi demonstrado que possua qualquer atividade antimicrobiana residual (Dunavant et al., 2006). Ademais, a clorexidina (CHX) também é utilizada de maneira a contribuir para a supressão do biofilme, através de sua propriedade da substantividade é capaz de inibir a adesão de certas bactérias à dentina (Gomes et al., 2013). Além dos dois citados, os agentes quelantes são usados para remover a camada de smear layer produzida durante a instrumentação mecânica; dentre eles o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) é um dos agentes mais comumente usados (Chávez de Paz et al., 2010).

No sentido de avaliar a eficácia dessas substâncias na eliminação do biofilme endodôntico vários trabalhos foram realizados.

Spratt et al. (2001) avaliaram a eficácia de: NaOCl (2,25%); 0,2% de gluconato de clorexidina (CHX); 10% de iodina de povidona; 5 ppm de prata coloidal; e solução salina tamponada com fosfato (controle), contra biofilmes de monocultura de cinco isolados, incluindo *Prevotella intermedia*; *Peptostreptococcus micros*; *Streptococcus intermedius*; *Fusobacterium nucleatum*; e *E. faecalis*. Os resultados mostraram que o NaOCl foi o antimicrobiano mais eficaz, seguido pela solução de iodo. Clegg et al. (2006) avaliaram a eficácia de três concentrações de NaOCl (6%, 3% e 1%), 2% de CHX e BioPure MTAD em biofilmes de dentina apical *in vitro*. Seus resultados indicaram que 6% de NaOCl era o único irrigante capaz de tornar as bactérias não viáveis e remover fisicamente o biofilme. Giardino et al. (2007) avaliaram a eficácia de 5,25% NaOCl e MTAD contra *E. faecalis* biofilme e descobriu que apenas 5,25% NaOCl pode desagregar e remover o biofilme.

Arias-Moliz et al. (2009) analisaram a concentração mínima para a erradicação de biofilme de: NaOCl; clorexidina; ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) e os ácidos cítrico e fosfórico, após 1, 5 e 10 min de exposição a biofilmes de *E. faecalis*. Seus resultados mostraram que o NaOCl foi o agente mais eficaz, capaz de erradicar os biofilmes após 1 min a uma concentração de 0,00625%. CHX erradicou biofilme após 5 min a 2%. EDTA e soluções de ácido cítrico e ácido fosfórico não foram eficazes contra os biofilmes a qualquer concentração ou tempo testado.

Bryce et al. (2009) verificaram a interrupção relativa e os efeitos bactericidas de NaOCl; clorexidina; EDTA; e iodo em biofilmes de espécies únicas e duplas de isolados do canal radicular (*Streptococcus sanguinis*, *E. faecalis*, *F. nucleatum* e *Porphyromonas gingivalis*). Os resultados mostraram que as espécies anaeróbias obrigatórias gram-negativas eram mais suscetíveis à remoção de células do biofilme do que as anaeróbias gram-positivas facultativas. O agente mais eficaz na eliminação dos biofilmes foi NaOCl.

3.7.2 Efeito da instrumentação no biofilme

As complexidades anatômicas e geométricas (por exemplo, deltas e istmos) nos sistemas de canais radiculares abrigam as bactérias aderentes, que ficam protegidas dos procedimentos de limpeza e moldagem. Assim, os microrganismos que desempenham um papel importante em doenças perirradiculares crescem principalmente em co-agregados, agregados e biofilmes sésseis (Takehashi et al., 1965; Nair, 1987).

Por instrumentação mecânica e irrigação com soluções tecido-líticas e antimicrobianas, além de medicações intracanaís, espera-se que a carga microbiana seja reduzida, levando à interrupção do biofilme (Siqueira et al., 2002). Contudo, em uma revisão da literatura, Nair et al., 2004, mostraram que 88% dos canais radiculares de molares mandibulares apresentaram infecção residual das raízes mesiais após a instrumentação, irrigação com NaOCl e obturação em sessão única.

Nakamura et al., em 2015, avaliaram a efetividade da instrumentação manual, rotatória e recíprocante na desinfecção de canais radiculares ovais infectados com biofilme de *Enterococcus faecalis*. Quarenta e cinco pré-molares inferiores humanos foram infectados com

uma cultura de *E. faecalis* (ATCC 29212) durante 28 dias. Cinco outros dentes que não foram nem contaminados nem instrumentados foram utilizados como controles. Os 45 espécimes foram divididos em três grupos experimentais (n = 15) com base na técnica de preparação do canal radicular utilizada: manual (tipo K, Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça); rotatório (Mtwo, VDW GmbH, Munique, Alemanha); e recíprocante (Reciproc R50, VDW GmbH, Munique, Alemanha). Durante a preparação químo-mecânica, foram utilizados 21 ml de NaOCl a 2,5% como a solução irrigante. A amostragem microbiológica foi realizada antes e imediatamente após a preparação químo-mecânica utilizando pontas de papel estéreis. Os espécimes foram então clivados e 0,02 g de microplaquetas de dentina foram coletados dos terços das raízes para verificar a presença de microrganismos nos túbulos dentinários. Os autores observaram que todas as três técnicas de preparação reduziram o número de microrganismos no lúmen do canal radicular e nos chips dentinários dos terços radiculares, mas não foram observadas diferenças significativas entre os três grupos ($p > 0,05$). A instrumentação alternativa com Reciproc R50 foi eficaz na redução do número de microrganismos dentro do sistema de canais radiculares. Embora esta técnica envolva o uso de uma lima para realizar a terapia do canal radicular, é tão eficaz quanto a instrumentação rotativa convencional na redução do *E. faecalis* do sistema de canais radiculares.

3.7.3 Efeito da agitação ultrassônica no biofilme

Os dispositivos de irrigação desempenham um papel importante na remoção de detritos em toda a extensão do canal radicular. Os modos de irrigação incluem irrigação estática, bem como irrigação dinâmica. Dois tipos de irrigações dinâmicas ultrassônicas têm sido descritas na literatura: uma em que a irrigação é combinada com a instrumentação ultrassônica simultânea (irrigação ultrassônica ativa) e outra relacionada à ação não cortante do inserto ativado ultrassonicamente (irrigação ultrassônica passiva).

Joy et al. (2015), com o objetivo de testar a efetividade de duas técnicas de irrigação, uma estática e outra ultrassônica passiva (PUI), na eliminação do biofilme radicular, realizaram um estudo, *ex vivo*. Quarenta incisivos centrais superiores com raízes e canais simples, foram alocados aleatoriamente em dois grupos para irrigação estática e PUI. Os canais radiculares foram preparados usando os instrumentos GT do sistema (Dentsply Maillefer, Switzerland).

Em seguida, foram divididos longitudinalmente em duas partes, colágeno corado foi aplicado às superfícies dos canais e os dentes foram remontados para o teste estático e PUI. Imagens digitais do canal foram tomadas antes e depois da irrigação com 9, 18, 27 e 37 ml de solução da NaOCl. As imagens digitais foram analisadas usando ImageJ Software (Instituto Nacional de Saúde, EUA) para quantificar o colágeno corado residual na parede dos canais radiculares. Como resultados, encontraram que o biofilme não pôde ser removido completamente por instrumentação ultrassônica passiva ou irrigação estática. Verificaram ainda que a PUI era mais eficaz no remoção de colágeno, especialmente na porção apical do canal radicular.

Cherian et al. (2016) comparando e avaliando os efeitos antimicrobianos da clorhexidina a 2% (CHX) versus dicloridrato de octenidina a 0,1% (OCT) como irrigante do canal radicular com e sem irrigação ultra-sônica passiva contra *Enterococcus faecalis*, encontraram que a octenidina (0,1%) foi mais eficaz do que a clorexidina a 2% contra *E. faecalis*. A irrigação ultrassônica passiva provou aumentar a ação antimicrobiana dos irrigantes.

3.7.4 Efeito da medicação intracanal no biofilme

Utilizando SEM e CLSM, Distel et al. (2002) observaram que *E. faecalis* foi capaz de formar biofilme em canais radiculares, apesar do curativo intracanal com hidróxido de cálcio. Foi observada colonização por *E. faecalis* de 46 raízes medicadas extraídas com a microscopia eletrônica de varredura (SEM) e microscopia laser confocal de varredura. A SEM detectou biofilmes em canais medicados com pasta de hidróxido de cálcio em média de 77 dias. A análise por microscopia confocal a laser de duas raízes medicadas com pasta de hidróxido de cálcio mostrou colônias viáveis formadas em um canal radicular infectado por 86 dias, enquanto que em um canal infectado por 160 dias, observou-se uma forma de cogumelo típica de um biofilme.

Zancan et al. (2016) com objetivo de avaliar a ação antimicrobiana do hidróxido de cálcio contra biofilmes, utilizaram a substância em várias apresentações, como: hidróxido de cálcio e solução salina, Calen (SS White Artigos Dentários Ltd, Rio de Janeiro, Brazil) (HC/P), Calen com paramonoclorofenol canforado (PMCC) (HC/PMCC) e uma pasta de hidróxido de cálcio com clorexidina (HC/CHX). Para a análise antimicrobiana, os biofilmes monospécies e de dupla espécie foram induzidos *in vitro* em blocos de dentina (N = 20). Depois, foram tratados

com as pastas durante 7 dias. Corante live / dead e um microscópio confocal foram usados para medir a porcentagem de células vivas. Os resultados mostraram que sete dias de contato podem ser insuficientes para a solução de hidróxido de cálcio + solução salina, pastas HC/P e HC/PMCC para matar células bacterianas nos biofilmes estudados. A CHX adicionada ao HC apresentou maior eficácia contra os biofilmes bacterianos.

4 DISCUSSÃO

O biofilme é composto por um substrato, uma matriz constituída por proteínas; polissacarídeos; ácidos nucleicos; e sal, e por um conjunto de células bacterianas, que representam 15% em volume do biofilme (Donlan e Costerton, 2002). Segundo Caldwell et al. (1997), essa forma de desenvolvimento, através da capacidade de auto-organização; da resistência a perturbações ambientais; e do sinergismo entre as espécies, atribui aos microrganismos a vantagem de sobreviver à condições ambientais severas.

Na infecção endodôntica, foi relatado que após a penetração dos microrganismos no sistema de canais radiculares, geralmente por meio da cárie dentária, ocorre sua adesão e difusão pela dentina radicular intracanal chegando ao forame, de onde podem passar para a parte externa da raiz e para a lesão periapical, formando igualmente biofilme nessas regiões (Nair, 1987; Tronstad et al., 1987 e 1990; Leonardo et al., 2002; Noiri et al., 2002; Ricucci et al., 2013; Siqueira et al., 2016).

A diversidade do biofilme endodôntico pode ser considerada atualmente alta, pois mais de 1000 espécies já foram recuperadas pela identificação da microbiota endodôntica, através de técnicas moleculares que permitem a detecção de bactérias incultiváveis (Marsh, 2003; Usha et al., 2010; Nobrega et al., 2016). Entretanto, além de bactérias, outros microrganismos podem ser detectados nas infecções endodônticas. Archaea e fungos tem sido ocasionalmente encontrados nas infecções intra-radulares (Waltimo et al., 1997; Siqueira et al., 2002; Vianna et al., 2006), contudo, o último pode ser mais prevalente em dentes tratados com doença pós-tratamento (Siqueira e Sen, 2004).

E. faecalis é um dos micro-organismos mais detectados em casos de retratamento (Sundqvist et al., 1998; Peciulienė et al., 2001; Rôças et al., 2004; Siqueira e Roças, 2004; Willians et al., 2006; Ozbek et al., 2009; Subramanian e Mickel, 2009; Barbosa-Ribeiro et al., 2016), sendo capazes de suportar condições severas de sobrevivência no canal radicular com grande variação de pH; temperatura; e tensão de O₂ (Gomes et al., 2008; Baik et al., 2011; Lee e Baek 2012). Ainda, é a espécie mais estudada por sua capacidade de formar biofilmes (Duggan e Sedgley, 2007; Al-Ahmad et al., 2009). Distel et al. (2002) e Nair et al. (2005) revelaram que biofilmes de *E. faecalis* podem ser resistentes aos procedimentos de instrumentação; irrigação; medicação; e obturação dos canais radiculares, principalmente em regiões de difícil acesso, como istmos e canais acessórios. Várias fatores de virulência

relacionados aos mecanismos de sobrevivência do *E. faecalis* estão descritos na literatura, como as pesquisas de Guzman et al. (1989) e Mohamed et al. (2004) que mostraram sua capacidade de aderir e infiltrar células epiteliais. Já Kishen et al., em 2006, observou a capacidade dessa bactéria de formar biofilmes persistentes associados a infecção refratária. Subramanian e Mickel (2009) reforçaram tais achados, afirmando que o *E. faecalis* pode contribuir na persistência das infecções periapicais pela formação de biofilmes, assim como por sua adesão e invasão de tecidos moles.

Embora *E. faecalis* tenha considerável destaque nas doenças pulpares e periapicais, os biofilmes de várias espécies, presentes nos canais radiculares, foram igualmente descritos em estudos anteriores, afirmando que o desenvolvimento da patologia endodôntica é dependente de associações entre as espécies. Essas associações bacterianas podem ser importantes, agindo sinergicamente e aumentando sua virulência, o que agrava os danos causados ao hospedeiro (Gomes et al., 1994; Chávez de Paz et al., 2015; Gao et al., 2016). Gao et al. (2016) mostraram que *E. faecalis* formou uma estrutura densa de biofilme na dentina do canal radicular na presença de *S. gordonii* e *A. viscosus*. Já Chávez de Paz et al. (2015) em estudo *in vitro* verificaram que *S. gordonii* foi completamente inibido por *E. faecalis*, mas *A. viscosus* mostrou melhor sobrevivência sob inatividade em coexistência com *E. faecalis* do que sozinho, em contraste com a nutrição abundante na qual *A. naeslundii* ou *A. viscosus* foram inibidos. *E. faecalis* foi mais resistente à inanição em coexistência com *S. gordonii* e *A. viscosus* do que sozinho. Essas interações interespecíficas podem ser uma razão pela qual *E. faecalis* frequentemente é dominante em canais previamente tratados e preenchidos.

Além disso, os mecanismos de resistência antimicrobiana dos biofilmes podem dificultar a recuperação do estado patológico endodôntico. Vários destes foram reportados, por exemplo Larsen et al. (2004), demonstraram que a comunicação entre as células pode influenciar a estrutura do biofilme, estimulando o crescimento de espécies benéficas para o mesmo. Dunavant et al. (2006) notaram que a matriz polissacarídica dos biofilmes pode retardar a difusão dos antibióticos, fazendo com que as enzimas extracelulares tais como a β -lactamase fiquem aprisionadas e concentradas na matriz, inativando assim os antibióticos β -lactâmicos. Ademais, outro mecanismo é a troca genética dentro do biofilme via transferência horizontal de genes, que corrobora a uma disseminação de genes de resistência a antibióticos entre diferentes espécies clinicamente relevantes. Para Madson et al. (2012), essas taxas de transferência de genes horizontais são tipicamente mais altas nas comunidades de biofilme do que em comparação com as de nichos planctônicos.

Para o estudo dos biofilmes, várias técnicas de criação *in vitro* foram desenvolvidas. Uma delas é a criação de biofilmes em membranas de nitrato celulose (0,2 µm de tamanho de poro, 13 mm de diâmetro), proposta por Sena e colaboradores, em 2006; nessa metodologia as membranas são colocadas sobre a superfície de placas de ágar com sangue de ovelha desfibrinadas a 5% (BHI) (para microrganismos aeróbios e facultativamente anaeróbios) e sobre ágar de anaeróbios fastidiosos (FAA) e são ainda inoculados com 20 µl de cada suspensão de microrganismo de teste. Mohamed et al., (2004) e Medeiros et al. (2014), utilizando placas de microtitulação de 96 poços estéreis de fundo plano (Falcon, Becton, Dickinson e Co, Franklin Lakes, NJ), incubaram uma colônia para cada cepa em caldo de soja trípico (TSB, Bacto Tryptic Soy Broth, contém 0,25% de glucose, Becton, Dickinson e Co). Após os períodos de crescimento e incubação, para quantificação do biofilme formado, o mesmo foi corado com cristal violeta e lido em um leitor de placas de microtitulação (Bio-Tek ELx800, Winooski, VT). Estrela et al. (2009) utilizaram como substrato a dentina de canais radiculares humanos, um meio de cultura e inóculos bacterianos de *E. faecalis*. Ainda, Guerreiro-Tanomaru e colaboradores em 2013, verificaram a formação de biofilme de *E. faecalis* em diferentes substratos (dentina bovina, guta-percha, hidroxiapatita, e osso bovino).

Para analisar esse biofilme formado e suas características, como: número; tipo; vitalidade; idade; espessura; estrutura e; topografia, várias outras técnicas foram desenvolvidas, com destaque para as colorimétricas e de microscopia (Kishen e Haapasalo, 2010). Stepanovic et al. (2000) e Medeiros et al. (2014), quantificaram o biofilme por uma técnica de leitura de placa modificada, que envolve a coloração com cristal violeta, a retenção do corante pelas células aderidas a placa de 96 poços e a medição da densidade ótica. Gao et al. (2016), avaliaram *in vitro*, por microscopia eletrônica de varredura (SEM), as infecções do canal radicular com biofilme de dupla espécie e de um grupo com múltiplas espécies. O método de análise evidenciou co-culturas de *E. faecalis* e *C. albicans*; e *E. faecalis* e *L. acidophilus*. O biofilme formado era relativamente fino na dentina do canal radicular, com os túbulos dentinários claramente visualizados. Outra técnica de microscopia é microscopia confocal de varredura à laser (CLSM). Qiu et al. (2016) verificaram a inibição na formação de biofilme do *S. mutans* pelo uso de antifúngicos. Seus resultados permitiram a conclusão de que dois dos antifúngicos utilizados inibiram a formação do biofilme de *S. mutans*. Além disso, as proporções de bactérias vivas / mortas foram significativamente menores do que as do grupo controle.

Várias formas de tratamento do biofilme endodôntico estão disponíveis e vem sendo estudadas há muito tempo na literatura. Dentre elas, encontramos as substâncias químicas

auxiliares e irrigantes, com o papel de ajudar na morte de bactérias e na remoção do biofilme bacteriano de superfícies não instrumentadas (Haapasalo et al., 2007). Um exemplo dessas substâncias é o hipoclorito de sódio, que é uma solução química auxiliar frequentemente usada na endodontia (Arias-Moliz et al., 2009). Outras soluções químicas auxiliares como a clorexidina (CHX) também são utilizadas na erradicação do biofilme (Gomes et al., 2013). Ainda, agentes quelantes são usados para remover a camada de smear layer produzida durante a instrumentação mecânica. O ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) é um dos agentes mais comumente usados (Chávez de Paz et al., 2010). Spratt et al. (2001), Arias-Moliz et al. (2009) e Bryce et al. (2009) verificaram a eficácia de várias substâncias contra o biofilme, e encontraram que tanto o NaOCl como a clorexidina são eficazes na redução bacteriana.

Por instrumentação mecânica e irrigação com soluções tecido-líticas e antimicrobianas, além de medicações intracanaís, espera-se que a carga microbiana seja reduzida, levando à interrupção do biofilme (Siqueira et al., 2002). Nakamura et al., em 2015, avaliaram a efetividade da instrumentação manual, rotatória e reciprocante na desinfecção de canais radiculares ovais infectados com biofilme de *Enterococcus faecalis*. Os autores observaram que as três técnicas de preparação reduziram o número de microrganismos no lúmen do canal radicular e nos terços radiculares, mas não foram observadas diferenças significativas entre os três grupos ($p > 0,05$).

Além disso, dois tipos de irrigações dinâmicas ultrassônicas têm sido descritas na literatura com o objetivo da remoção do biofilme. Uma delas, em que a irrigação é combinada com a instrumentação ultrassônica simultânea (irrigação ultrassônica ativa) e outra relacionada à ação não cortante do inserto ativado ultrassonicamente (irrigação ultrassônica passiva). Joy et al., (2015) e Cherian et al., (2016) notaram que o uso de irrigação ultrassônica melhora a ação antimicrobiana dos irrigantes e remoção de biofilme.

A medicação intracanal também é utilizada como tratamento entre sessões endodônticas, no entanto, seu papel é controverso. Distel et al. (2002) observaram que *E. faecalis* foi capaz de formar biofilme em canais radiculares, apesar do curativo intracanal com hidróxido de cálcio. Além disso, Zancan et al. (2016) mostraram que sete dias de contato podem ser insuficientes para que as soluções de hidróxido de cálcio + solução salina, pasta Calen (SS White Artigos Dentários Ltd, Rio de Janeiro, Brazil) e Calen com paramonoclorofenol canforado matem células bacterianas em biofilmes e que a clorexidina associada ao hidróxido de cálcio apresenta a maior eficácia contra os biofilmes bacterianos.

5 CONCLUSÃO

Com base na revisão de literatura realizada nesse estudo, foi possível concluir que:

- 1- O biofilme é uma comunidade microbiana séssil caracterizada por células que estão aderidas a um substrato, assim como uma as outras e envolvidas em uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares. Sua formação se dá com a penetração de microrganismo na polpa, seguida por sua difusão ao longo do canal radicular. Dessa forma, o biofilme pode estar localizado na parede interna radicular, próximo ao forame, na superfície externa da raiz e / ou na lesão periapical. Ademais, é constituído por espécies bacterianas pertencentes a 13 diferentes filotipos, embora a espécie mais encontrada na literatura seja o *E. faecalis*. Esta, por estar em comunidade, desenvolve mecanismos de resistência como a proteção contra antibióticos pela matriz polissacarídica e a transferência genética horizontal.
- 2- Os biofilmes são estudados *in vitro* utilizando-se modelos de formação em diversos substratos, como: placas de poliestireno; dentina humana; dentina bovina; e osso bovino. Para sua análise, técnicas colorimétricas e de microscopia, como a microscopia eletrônica de varredura e a microscopia confocal, são amplamente utilizadas.
- 3- O tratamento do biofilme endodôntico pode ser realizado pelo uso de substâncias químicas auxiliares e irrigantes, como o hipoclorito de sódio; a clorexidina; e o EDTA. Ademais, podem ser utilizadas variadas técnicas de instrumentação, como ativação ultrassônica passiva ou ativa e ainda pelo uso de medicação intracanal. Embora a vasta gama de tratamentos disponíveis e comprovado o efeito inibitório dos métodos citados, a redução ou máxima redução do biofilme dos canais radiculares ainda é tema de constantes pesquisas científicas na endodontia.

REFERÊNCIAS*

Al-Ahmad A, Müller N, Wiedmann-Al-Ahmad M, Sava I, Hübner J, Follo M, Schirrmeister J, Hellwig E. Endodontic and salivary isolates of *Enterococcus faecalis* integrate into biofilm from human salivary bacteria cultivated in vitro. *J Endod.* 2009 Jul;35(7):986-91. doi:10.1016/j.joen.2009.04.013

Arias-Moliz MT, Ferrer-Luque CM, Espigares-García M, Baca P. *Enterococcus faecalis* biofilms eradication by root canal irrigants. *J Endod.* 2009 May;35(5):711-4. doi:10.1016/j.joen.2009.01.018

Baik JE, Jang KS, Kang SS, Yun CH, Lee K, Kim BG et al. Calcium hydroxide inactivates lipoteichoic acid from *Enterococcus faecalis* through deacylation of the lipid moiety. *J Endod.* 2011 Feb;37(2):191-6. doi: 10.1016/j.joen.2010.11.007.

Barbosa-Ribeiro M, De-Jesus-Soares A, Zaia AA, Ferraz CC, Almeida JF, Gomes BP. Quantification of Lipoteichoic Acid Contents and Cultivable Bacteria at the Different Phases of the Endodontic Retreatment. *J Endod.* 2016 Apr;42(4):552-6. doi:10.1016/j.joen.2016.01.002.

Bryce G, O'Donnell D, Ready D, Ng YL, Pratten J, Gulabivala K. Contemporary root canal irrigants are able to disrupt and eradicate single- and dual-species biofilms. *J Endod.* 2009 Sep;35(9):1243-8. doi:10.1016/j.joen.2009.05.034..

Caldwell DE, Atuku E, Wilkie DC, Wivcharuk KP, Karthikeyan S, Korber DR, Schmid DF, Wolfaardt GM. Germ theory vs. community theory in understanding and controlling the proliferation of biofilms. *Adv Dent Res.* 1997 Apr;11(1):4-13. Review.

Chávez de Paz LE, Bergenholtz G, Svensäter G. The effects of antimicrobials on endodontic biofilm bacteria. *J Endod.* 2010 Jan;36(1):70-7. doi:10.1016/j.joen.2009.09.017.

* De acordo com as normas da UNICAMP/FOP, baseadas na padronização do International Committee of Medical Journal Editors - Vancouver Group. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o PubMed.

Chávez de Paz LE, Davies JR, Bergenholtz G, Svensäter G. Strains of *Enterococcus faecalis* differ in their ability to coexist in biofilms with other root canal bacteria. *Int Endod J*. 2015 Oct;48(10):916-25. doi:10.1111/iej.12501

Cherian B, Gehlot PM, Manjunath MK. Comparison of the Antimicrobial Efficacy of Octenidine Dihydrochloride and Chlorhexidine with and Without Passive Ultrasonic Irrigation - An Invitro Study. *J Clin Diagn Res*. 2016 Jun;10(6):ZC71-7. doi:10.7860/JCDR/2016/17911.8021.

Clegg MS, Vertucci FJ, Walker C, Belanger M, Britto LR. The effect of exposure to irrigant solutions on apical dentin biofilms in vitro. *J Endod*. 2006 May;32(5):434-7.

Conrads G, Gharbia SE, Gulabivala K, Lampert F, Shah HN. The use of a 16s rDNA directed PCR for the detection of endodontopathogenic bacteria. *J Endod*. 1997 Jul;23(7):433-8.

Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG, Ladd TI, Nickel JC, Dasgupta M, et al. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu Rev Microbiol*. 1987;41:435-64.

Distel JW, Hatton JF, Gillespie MJ. Biofilm formation in medicated root canals. *J Endod*. 2002 Oct;28(10):689-93.

Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev*. 2002 Apr;15(2):167-93.

Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis*. 2002 Sep;8(9):881-90. Review.

Duggan JM, Sedgley CM. Biofilm formation of oral and endodontic *Enterococcus faecalis*. *J Endod*. 2007 Jul;33(7):815-8.

Dunavant TR, Regan JD, Glickman GN, Solomon ES, Honeyman AL. Comparative evaluation of endodontic irrigants against *Enterococcus faecalis* biofilms. *J Endod*. 2006 Jun;32(6):527-31.

Estrela C, Sydney GB, Figueiredo JA, Estrela CR. A model system to study antimicrobial strategies in endodontic biofilms. *J Appl Oral Sci*. 2009 Mar-Apr;17(2):87-91.

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

Fabricius L, Dahlén G, Ohman AE, Möller AJ. Predominant indigenous oral bacteria isolated from infected root canals after varied times of closure. *Scand J Dent Res*. 1982 Apr;90(2):134-44.

Figdor D, Davies J. Cell surface structures of *Actinomyces israelii*. *Aust Dent J*. 1997 Apr;42(2):125-8.

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

Frank SA, Barbour AG. Within-host dynamics of antigenic variation. *Infect Genet Evol*. 2006 Mar;6(2):141-6. Review.

Gao Y, Jiang X, Lin D, Chen Y, Tong Z. The Starvation Resistance and Biofilm Formation of *Enterococcus faecalis* in Coexistence with *Candida albicans*, *Streptococcus gordonii*, *Actinomyces viscosus*, or *Lactobacillus acidophilus*. *J Endod*. 2016 Aug;42(8):1233-8. doi: 10.1016/j.joen.2016.05.002.

George S, Kishen A, Song KP. The role of environmental changes on monospecies biofilm formation on root canal wall by *Enterococcus faecalis*. *J Endod*. 2005 Dec;31(12):867-72.

Giardino L, Ambu E, Savoldi E, Rimondini R, Cassanelli C, Debbia EA. Comparative evaluation of antimicrobial efficacy of sodium hypochlorite, MTAD, and Tetraclean against *Enterococcus faecalis* biofilm. *J Endod*. 2007 Jul;33(7):852-5.

Gomes BP, Berber VB, Kokaras AS, Chen T, Paster BJ. Microbiomes of endodontic-periodontal lesions before and after chemomechanical preparation. *J Endod*. 2015 Dec;41(12):1975-84.

Gomes BP, Drucker DB, Lilley JD. Associations of specific bacteria with some endodontic signs and symptoms. *Int Endod J*. 1994 Nov;27(6):291-8.

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

Gomes BP, Pinheiro ET, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ. Microbial analysis of canals of root-filled teeth with periapical lesions using polymerase chain reaction. *J Endod*. 2008 May;34(5):537-40. doi: 10.1016/j.joen.2008.01.016.

Gomes BP, Vianna ME, Zaia AA, Almeida JF, Souza-Filho FJ, Ferraz CC. Chlorhexidine in endodontics. *Braz Dent J*. 2013;24(2):89-102. doi: 10.1590/0103-6440201302188.

Guerreiro-Tanomaru JM, de Faria-Júnior NB, Duarte MA, Ordinola-Zapata R, Graeff MS, Tanomaru-Filho M. Comparative analysis of *Enterococcus faecalis* biofilm formation on different substrates. *J Endod*. 2013 Mar;39(3):346-50. doi:10.1016/j.joen.2012.09.027.

Guzmán CA, Pruzzo C, LiPira G, Calegari L. Role of adherence in pathogenesis of *Enterococcus faecalis* urinary tract infection and endocarditis. *Infect Immun*. 1989 Jun;57(6):1834-8.

Haapasalo M, Qian W, Portenier I, Waltimo T. Effects of dentin on the antimicrobial properties of endodontic medicaments. *J Endod*. 2007 Aug;33(8):917-25.

Harn WM, Chen YH, Yuan K, Chung CH, Huang PH. Calculus-like deposit at apex of tooth with refractory apical periodontitis. *Endod Dent Traumatol*. 1998 Oct;14(5):237-40.

Ingle JI, Bakland LK, Baumgartner JC. *Endodontics*. PMPH-USA, St. Louis 6th ed, 2008. p. 268-85.

Jhajharia K, Parolia A, Shetty KV, Mehta LK. Biofilm in endodontics: A review. *J Int Soc Prev Community Dent*. 2015 Jan-Feb;5(1):1-12. doi: 10.4103/2231-0762.151956.

Joy J, Mathias J, Sagir VM, Babu BP, Chirayath KJ, Hameed H. Bacterial Biofilm Removal Using Static and Passive Ultrasonic Irrigation. *J Int Oral Health*. 2015 Jul;7(7):42-7.

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

Kishen A, George S, Kumar R. *Enterococcus faecalis*-mediated biomineralized biofilm formation on root canal dentine in vitro. J Biomed Mater Res A. 2006 May;77(2):406-15.

Kishen A, Haapasalo M. Biofilm models and methods of biofilm assessment. Endod Topics. 2010;22:58–78.

Larsen T. Susceptibility of *Porphyromonas gingivalis* in biofilms to amoxicillin, doxycycline and metronidazole. Oral Microbiol Immunol. 2002 Oct;17(5):267-71.

Lee SH, Baek DH. Antibacterial and neutralizing effect of human β -defensins on *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecalis* lipoteichoic acid. J Endod. 2012 Mar;38(3):351-6. doi: 10.1016/j.joen.2011.12.026.

Leonardo MR, Rossi MA, Silva LA, Ito IY, Bonifácio KC. EM evaluation of bacterial biofilm and microorganisms on the apical external root surface of human teeth. J Endod. 2002 Dec;28(12):815-8.

Lewis K. Riddle of biofilm resistance. Antimicrob Agents Chemother. 2001 Apr;45(4):999-1007.

Lleò MM, Bonato B, Tafi MC, Signoretto C, Boaretti M, Canepari P. Resuscitation rate in different enterococcal species in the viable but non-culturable state. J Appl Microbiol. 2001 Dec;91(6):1095-102.

Lomçali G, Sen BH, Cankaya H. Scanning electron microscopic observations of apical root surfaces of teeth with apical periodontitis. Endod Dent Traumatol. 1996 Apr;12(2):70-6.

Madsen JS, Burmølle M, Hansen LH, Sørensen SJ. The interconnection between biofilm formation and horizontal gene transfer. FEMS Immunol Med Microbiol. 2012 Jul;65(2):183-95. doi: 10.1111/j.1574-695X.2012.00960.x.

Marsh PD. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? Microbiology. 2003 Feb;149(Pt 2):279-94.

Medeiros AW, Pereira RI, Oliveira DV, Martins PD, d'Azevedo PA, Van der Sand S, Frazzon J, Frazzon AP. Molecular detection of virulence factors among food and clinical *Enterococcus*

faecalis strains in South Brazil. Braz J Microbiol. 2014 Apr 18;45(1):327-32. doi: 10.1590/S1517-83822014005000031.

Medvedev AE, Sabroe I, Hasday JD, Vogel SN. Tolerance to microbial TLR ligands: Molecular mechanisms and relevance to disease. J Endotoxin Res. 2006;12:133–50.

Mohamed JA, Huang W, Nallapareddy SR, Teng F, Murray BE. Influence of origin of isolates, especially endocarditis isolates, and various genes on biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. Infect Immun. 2004 Jun;72(6):3658-63. Erratum in: Infect Immun. 2005 Oct;73(10):7075.

Mohamed JA, Murray BE. Lack of correlation of gelatinase production and biofilm formation in a large collection of *Enterococcus faecalis* isolates. J Clin Microbiol. 2005 Oct;43(10):5405-7.

Munson MA, Pitt-Ford T, Chong B, Weightman A, Wade WG. Molecular and cultural analysis of the microflora associated with endodontic infections. J Dent Res. 2002 Nov;81(11):761-6. Erratum in: J Dent Res. 2003 Mar;82(3):247. J Dent Res. 2003 Jan;82(1):69

Nair PN, Henry S, Cano V, Vera J. Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after "one-visit" endodontic treatment. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2005 Feb;99(2):231-52..

Nair PN. Light and electron microscopic studies of root canal flora and periapical lesions. J Endod. 1987 Jan;13(1):29-39.

Nakamura VC, Candeiro GT, Cai S, Gavini G. Ex vivo evaluation of three instrumentation techniques on *E. faecalis* biofilm within oval shaped root canals. Braz Oral Res. 2015;29. pii: S1806-83242015000100224. doi:10.1590/1807-3107BOR-2015.vol29.0027

Nóbrega LM, Montagner F, Ribeiro AC, Mayer MA, Gomes BP. Bacterial diversity of symptomatic primary endodontic infection by clonal analysis. Braz Oral Res. 2016 Oct 10;30(1):e103. doi: 10.1590/1807-3107.

Noiri Y, Ehara A, Kawahara T, Takemura N, Ebisu S. Participation of bacterial biofilms in refractory and chronic periapical periodontitis. J Endod. 2002 Oct;28(10):679-83.

Ozbek SM, Ozbek A, Erdorgan AS. Analysis of *Enterococcus faecalis* in samples from Turkish patients with primary endodontic infections and failed endodontic treatment by real-time PCR SYBR green method. J Appl Oral Sci. 2009 Sep-Oct;17(5):370-4.

Pajkos A, Vickery K, Cossart Y. Is biofilm accumulation on endoscope tubing a contributor to the failure of cleaning and decontamination? J Hosp Infect. 2004Nov;58(3):224-9.

Peciuliene V, Reynaud AH, Balciuniene I, Haapasalo M. Isolation of yeasts and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis. Int Endod J. 2001 Sep;34(6):429-34.

Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Sousa EL, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. Int Endod J. 2003 Jan;36(1):1-11.

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

Qiu W, Ren B, Dai H, Zhang L, Zhang Q, Zhou X, Li Y. Clotrimazole and econazole inhibit *Streptococcus mutans* biofilm and virulence in vitro. Arch Oral Biol. 2017 Jan;73:113-120. doi: 10.1016/j.archoralbio.2016.10.011.

Ricucci D, Martorano M, Bate AL, Pascon EA. Calculus-like deposit on the apical external root surface of teeth with post-treatment apical periodontitis: report of two cases. Int Endod J. 2005 Apr;38(4):262-71.

Ricucci D, Loghin S, Siqueira JF Jr. Exuberant Biofilm infection in a lateral canal as the cause of short-term endodontic treatment failure: report of a case. J Endod. 2013 May;39(5):712-8. doi: 10.1016/j.joen.2012.12.008.

Ricucci D, Siqueira JF Jr. Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. J Endod. 2010 Aug;36(8):1277-88. doi: 10.1016/j.joen.2010.04.007.

Rôças IN, Siqueira JF Jr, Santos KR. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. J Endod. 2004 May;30(5):315-20. PubMed PMID: 15107642.

Rocha CT, Rossi MA, Leonardo MR, Rocha LB, Nelson-Filho P, Silva LA. Biofilm on the apical region of roots in primary teeth with vital and necrotic pulps with or without

radiographically evident apical pathosis. *Int Endod J*. 2008Aug;41(8):664-9. doi: 10.1111/j.1365-2591.2008.01411.x.

Saito D, Leonardo Rde T, Rodrigues JL, Tsai SM, Höfling JF, Gonçalves RB. Identification of bacteria in endodontic infections by sequence analysis of 16SrDNA clone libraries. *J Med Microbiol*. 2006 Jan;55(Pt 1):101-7.

Sedgley C, Buck G, Appelbe O. Prevalence of *Enterococcus faecalis* at multiple oral sites in endodontic patients using culture and PCR. *J Endod*. 2006Feb;32(2):104-9.

Sen BH, Piskin B, Demirci T. Observation of bacteria and fungi in infected root canals and dentinal tubules by SEM. *Endod Dent Traumatol*. 1995Feb;11(1):6-9.

Sena NT, Gomes BP, Vianna ME, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, et al. In vitro antimicrobial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine against selected single-species biofilms. *Int Endod J* 2006 Nov;39:878-85.

Shrestha A, Kishen A. Antibiofilm efficacy of photosensitizer-functionalized bioactive nanoparticles on multispecies biofilm. *J Endod*. 2014 Oct;40(10):1604-10. doi: 10.1016/j.joen.2014.03.009.

Siqueira JF Jr, Antunes HS, Rôças IN, Rachid CT, Alves FR. Microbiome in the Apical Root Canal System of Teeth with Post-Treatment Apical Periodontitis. *PLoS One*. 2016 Sep 30;11(9):e0162887. doi: 10.1371/journal.pone.0162887.

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

Siqueira JF, Jr, Rôças IN, Santos SR, Lima KC, Magalhães FAC, de Uzeda M. Efficacy of Instrumentation techniques and irrigation regimens in reducing the bacterial population within root canals. *J Endod*. 2002 Mar;28:181-4.

Siqueira JF Jr, Rôças IN. Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 2--Redefining the endodontic microbiota. *J Endod*. 2005Jul;31(7):488-98.

Siqueira JF Jr, Rôças IN. Uncultivated phylotypes and newly named species associated with primary and persistent endodontic infections. *J Clin Microbiol*. 2005 Jul;43(7):3314-9.

Siqueira JF Jr, Sen BH. Fungi in endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2004 May;97(5):632-41.

Siqueira JF, Rôças IN, Moraes SR, Santos KR. Direct amplification of rRNA gene sequences for identification of selected oral pathogens in root canal infections. *Int Endod J*. 2002 Apr;35(4):345-51.

Siqueira JF Jr, Rôças IN. Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. *J Endod*. 2008 Nov;34(11):1291-1301. doi:10.1016/j.joen.2008.07.028.

Spratt D, Pratten J. Biofilms and the oral cavity. *Rev Environ Sci Bio Technol*. 2003:109–20.

Spratt DA, Pratten J, Wilson M, Gulabivala K. An in vitro evaluation of the antimicrobial efficacy of irrigants on biofilms of root canal isolates. *Int Endod J*. 2001 Jun;34(4):300-7.

Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods*. 2000 Apr;40(2):175-9.

Subramanian K, Mickel AK. Molecular analysis of persistent periradicular lesions and root ends reveals a diverse microbial profile. *J Endod*. 2009 Jul;35(7):950-7. doi:10.1016/j.joen.2009.04.010.

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

Svensäter G, Bergenholtz G. Biofilms in endodontic infections. *Endod Topics*. 2004;9:27–36.

Takemura N, Noiri Y, Ehara A, Kawahara T, Noguchi N, Ebisu S. Single species biofilm-forming ability of root canal isolates on gutta-percha points. *Eur J Oral Sci*. 2004 Dec;112(6):523-9.

Tronstad L, Barnett F, Riso K, Slots J. Extraradicular endodontic infections. *Endod Dent Traumatol.* 1987;3:86–90.

Tronstad L, Barnett F, Cervone F. Periapical bacterial plaque in teeth refractory to endodontic treatment. *Endod Dent Traumatol.* 1990;6:73–7.

Tronstad L, Sunde PT. The evolving new understanding of endodontic infections. *Endo Topics.* 2003;6:57–77.

Usha HL, Kaiwar A, Mehta D. Biofilm in endodontics: New understanding to an old problem. *Int J Contem Dent.* 2010;1:44–51.

Vianna ME, Conrads G, Gomes BP, Horz HP. Identification and quantification of archaea involved in primary endodontic infections. *J Clin Microbiol.* 2006Apr;44(4):1274-82.

Waltimo TM, Sirén EK, Torkko HL, Olsen I, Haapasalo MP. Fungi in therapy-resistant apical periodontitis. *Int Endod J.* 1997 Mar;30(2):96-101.

Williams JM, Trope M, Caplan DJ, Shugars DC. Detection and quantitation of *E. faecalis* by real-time PCR (qPCR), reverse transcription-PCR (RT-PCR), and cultivation during endodontic treatment. *J Endod.* 2006 Aug;32(8):715-21.

Wilson M. Susceptibility of oral bacterial biofilm to antimicrobial agents. *J Med Microbiol.* 1996;44:79–87

Zancan RF, Vivian RR, Milanda Lopes MR, Weckwerth PH, de Andrade FB, Ponce JB, Duarte MA. Antimicrobial Activity and Physicochemical Properties of Calcium Hydroxide Pastes Used as Intracanal Medication. *J Endod.* 2016 Dec;42(12):1822-1828.doi: 10.1016/j.joen.2016.08.017.