

INVESTIGAÇÃO MOLECULAR DA PRESENÇA DE BACTÉRIAS ESPECÍFICAS NAS LESÕES PERIAPICAIS CRÔNICAS ASSOCIADAS AO INSUCESSO DO RETRATAMENTO ENDODÔNTICO

SPOSITO, Otávio da Silva¹; Signoretti, Fernanda Graziella Correa²; Gomes, Brenda Paula²; JACINTO, Rogério de Castilho³

¹Universidade Federal de Pelotas/Odontologia; ²Universidade de Campinas/Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Departamento de Odontologia Restauradora; ³ Universidade Federal de Pelotas/Faculdade de Odontologia, Departamento de Semiologia e Clínica – rogeriocastilho@hotmail.com

1 INTRODUÇÃO

Infecções endodônticas são doenças inflamatórias sintomáticas ou assintomáticas causadas por microrganismos presentes no sistema de canais radiculares (Siqueira, 2002). Mesmo após a limpeza, modelagem e obturação do sistema de canais radiculares, seguida de uma restauração satisfatória do elemento dental, uma pequena fração dos casos mostra evidências de lesões perirradiculares persistentes (Salehrabi & Rotstein, 2004).

A persistência de bactérias tanto nos tecidos intrarradicular quanto perirradicular pode resultar em infecções refratárias ou recorrentes (Sjogren *et al.*, 1990; Abou-Rass & Bogen, 1998; Siqueira *et al.*, 2008).

Pesquisas anteriores, avaliando através de microscopia de luz e cultura, demonstravam que lesões periapicais conteriam uma carga microbiana não significativa, ou mesmo ausente (Block *et al.*, 1976; Walton *et al.*, 1992). No entanto ambas as técnicas apresentam limitações na detecção de bactérias, dessa forma, métodos como o PCR vem sendo amplamente utilizado com o objetivo de identificar tal microbiota (Siqueira, 2002).

A melhor caracterização das comunidades microbianas presentes no tecido perirradicular através do uso de métodos moleculares permite que sua patogênese seja mais bem entendida, o que representa importância clínica significativa.

O objetivo deste estudo foi identificar a presença de bactérias específicas presentes no tecido de lesões perirradiculares persistentes, utilizando os métodos de PCR.

2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

Foram selecionados pacientes (n=20) com indicação de cirurgia parendodôntica devido ao insucesso do tratamento endodôntico, submetidos à coleta durante a curetagem do tecido periapical.

Os critérios levados em conta para seleção dos pacientes foram: retratamento endodôntico prévio com no mínimo 2 anos (dentes assintomáticos) e/ou presença de sinais e sintomas associados ao dente (e.g. dor à percussão); ausência de fratura radicular; ausência de história de antibioticoterapia recente e uso de antifúngicos (mínimo de 3 meses) e ausência de doenças sistêmicas e doença periodontal.

Na consulta inicial foi realizada tomada radiográfica periapical. A lesão periapical excisada foi subdividida e enviada tanto para diagnóstico histopatológico, como submetida a análise por métodos moleculares.

A técnica de PCR foi utilizada para a análise da presença de *Enterococcus faecalis*, *Gemella morbillorum*, *Treponema denticola*, *Treponema socranskii*, *Tanarella forsythia*, *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella tanneriae*, *Prevotella nigrescens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Filifactor alocis*, *Parvimonas micra* nas coletas.

O DNA bacteriano foi extraído e submetido a reações de PCR simples, com o uso de primers espécie-específicos para melhor caracterização da comunidade microbiana presente.

A extração de DNA bacteriano foi realizada com o QIA amp DNA kit (QIAGEN, Chatsworth, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante.

A reação de PCR foi processada na quantidade de 25 µL de uma mistura de reagentes (Master Mix) contendo suas quantidades específicas para 1,5 µL do DNA da amostra.

As reações de PCR contendo primers espécie-específicos foram realizadas em um aparelho termociclador convencional e submetidas a vários gradientes de temperatura (MJ96G, Biocycler, termocicladores, Curitiba, SC, Brasil) utilizando amostras ATCCs correspondentes e baseadas na literatura de suporte.

As amostras após a reação de PCR (produtos da amplificação), serão conservadas a 4 °C ou analisadas imediatamente por eletroforese. Utilizar-se-á gel de agarose a 1% (Invitrogen® - Life Technology do Brasil) em tampão de Tris-borato EDTA (pH 8,0) e corado com brometo de etídio (5µg/mL-Invitrogen® - Life Technology do Brasil).

Os dados coletados, referentes aos aspectos clínicos e radiográficos e às espécies bacterianas isoladas dos dentes estudados, serão introduzidos numa planilha de cálculo (QUATTRO PRO, Bordland International Inc., Scotts Valley, CA, EUA) e estatisticamente analisados usando SPSS for Windows (SPSS Inc., Chicago, Illinois, EUA).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em todos os casos DNA bacteriano estava presente. As espécies mais frequentes foram: *Parvimonas micra* (50%), *Treponema socranskii*(40%), *Gemellamorbillorum*(25%), *Prevotellatanneriae*(15%). Embora tenha sido identificado até sete espécies bacterianas em um mesmo caso, a maioria (55%) apresentou apenas uma das espécies pesquisadas. Histologicamente 13 dos 20 casos apresentaram característica de cisto periapical e os demais de granuloma.

Estudos indicam que as lesões perirradiculares persistentes são causadas por bactérias resistentes ao tratamento endodôntico ou por uma recontaminação do canal radicular (Schirmer et al 2009). As infecções crônicas associadas ao insucesso do tratamento endodôntico podem ter sua origem tanto no tecido periradicular (Sunde et al 2003) ou em um biofilme na superfície da extremidade da raiz, que é protegido contra as defesas do hospedeiro e é resistente à antibioticoterapia (Tronstad et al 1990). Enquanto bactérias no biofilme são importantes para a persistência da infecção, as células planctônicas nos tecidos exercem um papel na exacerbação das doenças infecciosas periapicais (VanDevanter et al 2005).

No presente estudo, DNA bacteriano foi detectado em todas as amostras, indicando a presença de bactérias na lesão periapical e apontando para um papel etiológico importante destas bactérias na maioria das lesões. Todas as amostras de

tecido periosteal coletados subjacentes ao local da cirurgia não mostrou DNA bacteriano, indicando que o sítio cirúrgico era estéril.

A espécie encontrada em mais alta frequência nas lesões periapicais foi *Parvimonas micra*, uma espécie Gram-positiva, anaeróbia estrita, que teve sua capacidade de aderir ao epitélio demonstrada *in vitro* (Kremer et al 1999), bem como foi demonstrado que participa de infecções polimicrobianas como abscessos apicais (Murdoch ET AL 1988). Estes dados sugerem que *P. micra* pode estar associada a infecções crônicas e pode ser importante na persistência da infecção perirradicular.

O *Enterococcus faecalis*, uma espécie de bactérias gram-positivas facultativas, não foi detectado em nenhuma das amostras. Este dado é contrastante com pesquisas que demonstraram a prevalência de *E. faecalis* em canais radiculares com infecções endodônticas persistentes variando de 24% para 77%, e, quando encontrado, ele dominou o perfil microbiológico desses canais radiculares (Cheung et al 2001; Stuart et al 2006; Sundqvist ET AL 1998). *E. faecalis* tem capacidade de aderir e invadir células epiteliais (30) e de formar biofilmes persistente associada com infecções refratárias (Guzman ET AL 1989). Formação de biofilme de *E. faecalis* também foi mostrado no canal radicular dentina (Mohamed et al 2004; Kishen ET AL 2006) *in vitro*. Embora as bactérias em ápices radiculares são protegidas pelo biofilme apical, as bactérias no tecido perirradicular são expostas aos mecanismos de defesa do hospedeiro. Assim, apenas aquelas espécies que são capazes de adesão e invasão de tecido e têm a capacidade de superar a defesa do hospedeiro podem persistir nos tecidos moles. Em resumo, nossos dados sugerem que as lesões perirradiculares persistentes são infecções polimicrobianas, e muitas espécies bacterianas anteriormente não cultivadas e desconhecidas podem contribuir para o desenvolvimento e persistência de tais lesões.

4 CONCLUSÃO

A ocorrência das espécies investigadas nas lesões periapicais crônicas indica que potencialmente desempenham um papel na patogênese da periodontite apical persistente e que tem a capacidade de romper as defesas externas da raiz e se multiplicar na região periapical. Além disso, na maioria dos casos, o tecido associado a esse tipo de patologia apresenta características císticas.

5 REFERÊNCIAS

Abou-Rass M, Bogen G. Microorganisms in closed periapical lesions. **Int Endod J**, 31: 39-47, 1998.

Block RM, Bushell A, Rodrigues H, Langeland K. A histopathologic, histobacteriologic, and radiographic study of periapical endodontic surgical specimens. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, 42: 656-78, 1976.

Cheung GS, Ho MW. Microbial flora of root canal-treated teeth associated with asymptomatic periapical radiolucent lesions. **Oral Microbiol Immunol**, 16: 332-7, 2001.

Guzman CA, Pruzzo C, Li Pira G, et al. Role of adherence in pathogenesis of *Enterococcus faecalis* urinary tract infection and endocarditis. **Infect Immun**, 57: 1834-8, 1989.

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

Kremer BH, Herscheid AJ, Papaioannou W, et al. Adherence of Peptostreptococcus micros morphotypes to epithelial cells in vitro. **Oral Microbiol Immunol**, 14: 49–55, 1999.

Mohamed JA, Huang W, Nallapareddy SR, et al. Influence of origin of isolates, especially endocarditis isolates, and various genes on biofilm formation by Enterococcus faecalis. **Infect Immun**, 72:3658–63, 2004.

Murdoch DA, Mitchelmore IJ, Tabaqchali S. Peptostreptococcus micros in polymicrobial abscesses. **Lancet**, 1:594, 1988

Salehrabi R, Rotstein I. Endodontic treatment outcomes in a large patient population in the USA: an epidemiological study. **J Endod**, 30: 846-50, 2004.

Schirrmeister JF, Liebenow AL, Pelz K, et al. New bacterial compositions in rootfilled teeth with periradicular lesions. **J Endod**, 35:169–74, 2009.

Siqueira JF Jr. Endodontic infections: concepts, paradigms and perspectives. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, 94: 281-93 , 2002.

Siqueira JF Jr, Roças IN, Debelian GJ, Carmo FL, Paiva SSM, Alves FRF, Rosado AF. Profiling of root canal bacterial communities associated with chronic apical periodontitis from Brazilian and Norwegian subjects. **J Endod**, 34: 1457-61, 2008.

Sjogren U, Hagglund B, Sundqvist G, Wing K. Factors affecting the long-term results of endodontic treatment. **J Endod**, 16: 498-504, 1990.

Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, et al. Enterococcus faecalis: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. **J Endod**, 32:93–8, 2006.

Sunde PT, Olsen I, Gobel UB, et al. Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of bacteria in periapical lesions of asymptomatic root-filled teeth. **Microbiology**, 149:1095–102, 2003.

Sundqvist G, Figdor D, Persson S, et al. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, 85:86–93, 1998.

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

Van Devanter DR, Van Daltsen JM. How much do Pseudomonas biofilms contribute to symptoms of pulmonary exacerbation in cystic fibrosis? **Pediatr Pulmonol**, 39:504–6, 2005.