



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



Investigação molecular das bactérias *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* e *Porphyromonas endodontalis* em canais radiculares de dentes com lesão endo-periodontal combinadas

Bruna Isabelle Ferraz de Toledo¹, Heloa Rodrigues de Andrade¹, Julia Teixeira Ramos¹,
Kamily Gabrieli Ferreira de Souza¹, Rafaela Casadei Chapola², Maicon Ricardo Zieberg
Passin², Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes³

¹ – Aluno PIBIC-EM; ² – Monitor; ³ - Orientador

RESUMO

Lesões endo-periodontais combinadas são definidas como as alterações patológicas que acometem tanto o tecido pulpar como o periodontal no mesmo dente. Bactérias e seus subprodutos são os principais responsáveis pelo desenvolvimento destas patologias. A detecção destes patógenos pelos método de cultura apresenta limitações, pois muitos são de difícil crescimento. O objetivo deste estudo foi investigar a presença das bactérias *Tannerella forsythia* (Tf), *Treponema denticola* (Td) e *Porphyromonas endodontalis* (Pe) em canais radiculares (CR) e bolsas periodontais (BP), de dentes com lesões endo-periodontais combinadas. Foram realizadas coletas clínicas nos CR's e BP's de 14 dentes com necrose pulpar e bolsa periodontal associada. Os microrganismos foram identificados através do Nested-PCR, utilizando-se primers espécies-específicos para Tf, Td e Pe. Nas amostras dos CR's, a maior frequência foi de Pe (8/14 – 57,1%), seguida de Td (7/14 – 50%) e Tf (3/14 – 21,4%). Nas BP's Td foi a bactéria mais encontrada (13/14 - 92,8%), seguida de Tf (11/14 - 78,5%) e Pe (8/14 – 57,1%). Pode-se concluir que as bactérias *T. forsythia*, *T. denticola* e *P. endodontalis* são patógenos envolvidos em diferentes frequências na etiopatogenia das lesões endo-periodontais, sendo mais detectadas nas bolsas periodontais.



1 . INTRODUÇÃO

As lesões endoperiodontais, são caracterizadas por alterações patológicas com envolvimento pulpar e periodontal em um mesmo dente. Elas surgem em decorrência de uma infecção polimicrobiana que ativa as células do hospedeiro, causando uma ampla liberação de mediadores inflamatórios, que promovem destruição nos tecidos periodontal e pulpar (Gomes et al., 2015).

A detecção de inúmeros supostos patógenos orais em infecções endodônticas é dificultada se apenas os métodos tradicionais de cultura microbiana forem utilizados. Dentre os microrganismos difíceis de cultivar estão: *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* e *Porphyromonas endodontalis* (Gomes et al., 2005, 2006, 2007).

2. OBJETIVO

investigar a presença das bactérias *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* e *Porphyromonas endodontalis* em canais radiculares e bolsas periodontais, de dentes com lesões endo-periodontais combinadas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FOP/UNICAMP (Número do CAAE: 86140218.0.0000.5418). Todos os procedimentos clínicos e coletas das amostras foram realizados pela Doutoranda Rafaela Casadei Chapola.

3.1 Coleta das amostras

Para coleta no interior dos canais, após a abertura coronária, tres cones de papel absorventes foram introduzidos no comprimento pré-determinado pelo localizador foraminal, permanecendo nesta posição por 60s (Figura 1A). As respectivas bolsas periodontais dos dentes afetados foram coletadas utilizando 3 cones de papel absorventes estéreis em contato de 60s (Figura 1B). Em seguida, as amostras foram inseridas em tubos estéreis contendo 1 mL de tampão TE para a extração de DNA.

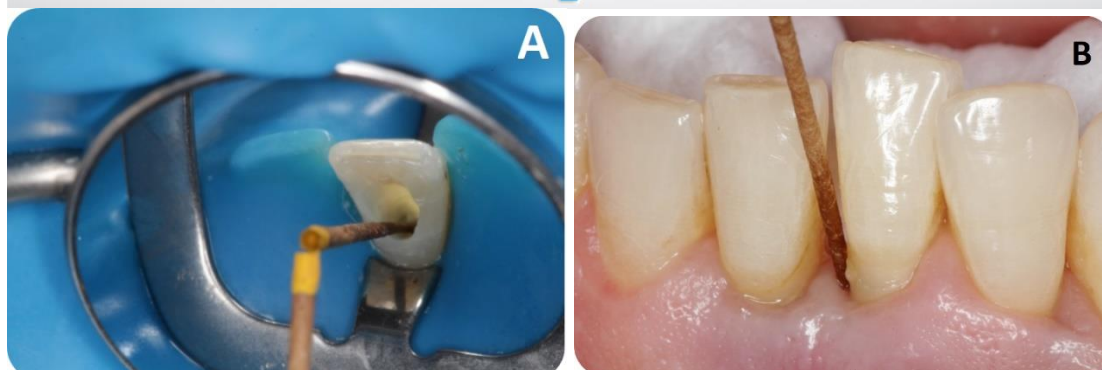


Figura 1 – Coleta das Amostras. **A**-Coleta das amostras no canal radicular. **B**-Coleta das amostras na bolsa periodontal.

3.2 Extração de DNA e Nested PCR

Para a execução da técnica de Nested-PCR foi necessária a extração do DNA microbiano pelo *QIAamp DNA Micro Kit* (QIAGEN, Valencia, CA, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante.

A técnica de Nested-PCR foi empregada para a detecção das espécies *T. forsythia*, *T. denticola* e *P. endodontalis*. As condições da reação de PCR foram descritas previamente por Kumar *et al.* (2003). Os primers específicos para cada espécie podem ser verificados na Tabela 1.

Tabela 1 – Primers utilizado neste estudo para realização de Nested-PCR

Primer	Localização	Sequencia (5'-3')
785	Primer universal (1ª reação)	GGATTAGATACCCTGGTAGTC
422	Primer universal (1ª reação)	GGAGTATTTAGCTT
L189	Primer universal (2ª reação)	GGTACTTABATGTTTCAGTTC
Tf	<i>T. forsythia</i>	TGCGATATAGTGTAAGCTCTACAG
Td	<i>T. denticola</i>	CAAGAGCAATGACATAGAGATATGG
Pe	<i>P. endodontalis</i>	TTTAGATGATGGCAGATGAGAG

4. RESULTADOS

Entre as espécies bacterianas investigadas nas 14 amostras coletadas dos canais radiculares foram encontradas: *P. endodontalis* (8/14 – 57,1%), *T.*



T. denticola (7/14 – 50%) e *T. forsythia* (3/14 – 21,4%). Nas bolsas periodontais foram encontradas: *T. denticola* (13/14 - 92,8%), *T. forsythia* (11/14 - 78,5%) e *P. endodontalis* (8/14 – 57,1%) (Figura 2).

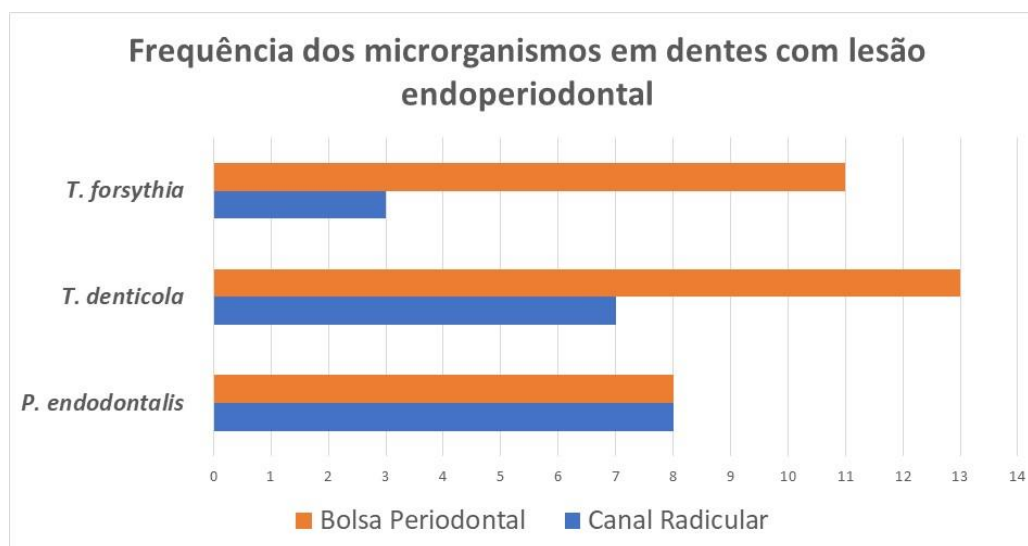


Figura 2 - Frequência das espécies bacterianas nas bolsas periodontais e nos canais radiculares de dentes com lesão endo-periodontal combinadas.

5. DISCUSSÃO

O presente estudo investigou amostras clínicas coletadas de 14 dentes com lesão endo-periodontal combinadas buscando detectar através da técnica de Nested-PCR, as bactérias *T. forsythia*, *T. denticola* e *P. endodontalis*. Estas espécies investigadas foram detectadas em diferentes frequências nos casos investigados, sendo que a bactéria mais frequente nos canais radiculares foi *P. endodontalis* e nas bolsas periodontais foi *T. denticola*. A detecção destas espécies está de acordo com os resultados de Gomes et al (2015) que também encontraram tais bactérias em canais radiculares e bolsas periodontais de dentes com lesão endo-periodontal combinadas.

Estudos anteriores que buscaram detectar *P. endodontalis* por cultura demonstraram baixa frequência destas bactérias nas infecções endodônticas (Jacinto et al., 2003). No entanto, no presente trabalho, utilizando Nested-PCR, esta espécie foi detectada na maioria dos casos, e em ambos os sítios. Segundo Socransky & Haffajee (2003), o Complexo Vermelho, formado pelas bactérias



Tannerella forsythia, *Porphyromonas gingivalis* e *Treponema denticola*, é o grupo mais investigado dentro das patologias periodontais. Neste estudo foi investigada a presença de dois dos patógenos pertencentes a este grupo (*T. forsythia* e *T. denticola*) e eles estiveram presentes na maioria das amostras das bolsas periodontais.

6. CONCLUSÕES

Pode-se concluir que as bactérias *T. forsythia*, *T. denticola* e *P. endodontalis* são patógenos envolvidos em diferentes frequências na etiopatogenia das lesões endo-periodontais, sendo mais detectadas nas bolsas periodontais.

7. AGRADECIMENTOS

FAPESP (2015/2347-9); CNPq (303852/2019) e CAPES (financial code 001).

8. BIBLIOGRAFIA

- Gomes BP, Jacinto RC, Pinheiro ET, Zaia AA, Ferraz CCR, SouzaFilho FJ. Porphyromonas gingivalis, Porphyromonas endodontalis, Prevotella intermedia and Prevotella nigrescens in endodontic lesions detected by culture and by PCR. Oral Microbiol Immunol. 2005; 20: 211-5.
- Gomes BP, Jacinto RC, Pinheiro ET, Sousa EL, Zaia AA, Ferraz CCR, SouzaFilho FJ. Molecular analysis of Filifactor alocis, Tannerella forsythia, and Treponema denticola associated with primary endodontic infections and failed endodontic treatment. J Endod. 2006; 32: 937-40.
- Gomes BP, Montagner F, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CC, Sousa-Filho FJ, Polymerase chain reaction of Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola and Tannerella forsythia in primary endodontic infection. J Endod. 2007; 33: 1049-52.
- Gomes BP, Berber VB, Kokaras AS, Chen T, Paster BJ. Microbiomes of Endodontic-Periodontal Lesions before and after Chemomechanical Preparation. J Endod. 2015; 41: 1975 - 84.
- Jacinto RC, Gomes BPFA, Ferraz CCR, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Microbiological analysis of infected root canals from symptomatic and asymptomatic teeth with periapical periodontitis and the antimicrobial susceptibility anaerobic bacteria. Oral Microbiol Immunol 2003; 18: 285–92.
- Kumar PS, Griffen AL, Barton JA, Paster BJ, Moeschberger ML, Leys EJ. New bacterial species associated with chronic periodontitis. J Dent Res 2003; 82:338-44
- Socransky SS, Haffajee AD. Microbiology of periodontal disease. Clinical Periodontology and Implant Dentistry: Blackwell Munksgaard; 2003. p. 106-149.