



*Investigação do efeito do preparo químico-mecânico sob as bactérias do Complexo Vermelho e sob os níveis de endotoxinas, em canais radiculares e bolsas periodontais de dentes com lesões endo-periodontais combinadas*

## **Introdução**

A relação entre polpa e periodonto é entendida como embriológica, anatômica e funcional (Chacker, 1974; Christie e Holthuis, 1990). Devido à embriogênese desses tecidos ocorrer concomitantemente, são formadas diversas vias de comunicação entre eles, como: túbulos dentinários, forame apical, canais secundários/laterais/acessórios (Gomes et al., 1996a; Rotstein e Simon, 2004). Essas vias de comunicação permitem a troca de agentes nocivos e demonstram o efeito que um tecido exerce sob o outro, sendo, assim um importante fator na etiopatogenia das lesões endo-periodontais combinadas (LEPC), ou seja, em que há presença concomitante de necrose pulpar e doença periodontal em um mesmo elemento dental (Sunitha et al., 2008).

A literatura relata fortes relações entre canais radiculares infectados e doença periodontal, acometendo um mesmo elemento dental (Kipiotti et al., 1984; Kobayashi et al., 1990; Pereira et al., 2011; Gomes et al., 2015). Entretanto, poucos são os estudos que comprovam a similaridade entre a microbiota endodôntica-periodontal. Além disso, a literatura ainda é escassa quanto aos efeitos do tratamento endodôntico sob os microrganismos e seus fatores de virulência nas bolsas periodontais e canais radiculares, nos dentes com lesões endodônticas-periodontais combinadas.

A instrumentação mecânica dos canais radiculares, pelos instrumentos utilizados na Endodontia, não é capaz de descontaminar completamente algumas áreas, devido à anatomia complexa do sistema de canais radiculares (Byström et al., 1985; Gomes et al., 1996a). Portanto, a máxima diminuição de patógenos e de seus fatores de virulência é obtida, através da utilização de substâncias químicas auxiliares, como a clorexidina, que tem se destacado devido à sua ampla capacidade de ação antimicrobiana, substantividade e baixa citotoxicidade (Ferraz et al. 2001, Gomes et al., 2001, Vivacqua Gomes et al., 2002; Vianna et al., 2004; Gomes et al., 2005; Ferraz et al., 2007; Oliveira, 2013).

O Complexo Vermelho é constituído por um grupo de bactérias Gram-negativas anaeróbias estritas (*Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*), altamente relacionadas à gravidade das patologias periodontais (Socransky et al., 1998). Por isso, a grande importância em estudar esse consórcio bacteriano nas bolsas periodontais e canais radiculares, em dentes com LEPC, além de verificar a vulnerabilidade dessas bactérias, em ambos os sítios, aos procedimentos biomecânicos de desinfecção do canal radicular.

A notória vantagem dos métodos, baseados nos princípios da biologia molecular, é o reconhecimento de bactérias anaeróbias, de árduo cultivo, como as que compõem o Complexo Vermelho (Willis et al., 1999; Gomes e Montagner, 2010). Dentre as técnicas moleculares existentes, podemos destacar o Nested-PCR. Nesta modalidade de PCR, o ensaio laboratorial é realizado em duas etapas, consecutivamente. A primeira reação é feita com primers universais, em o que o gene bacteriano 16S rRNA é amplificado, posteriormente à extração do DNA das amostras.

Após, é executada uma segunda reação de amplificação, através dos primers espécies-específicos, que irão se anelar internamente à uma sequência de nucleotídeos específicos, no primeiro fragmento, gerado pela reação universal, conferindo à técnica de Nested-PCR especificidade e sensibilidade superiores àquelas obtidas em PCR simples (Willis et al., 1999; Gomes e Montagner, 2010).

Dentre os fatores de virulência bacteriana, o lipopolissacarídeo (LPS), também denominado endotoxina, faz parte da estrutura da membrana externa, da parede celular, de espécies bacterianas Gram-negativas. O potencial patogênico, das referidas bactérias, está relacionado com a presença desse importante fator de virulência, em processos inflamatórios que acometem a polpa e os tecidos periapicais.

Sendo assim, esse estudo teve como proposta investigar a capacidade do preparo químico mecânico (PQM) sob as bactérias do Complexo Vermelho e sob o conteúdo endotóxico, nas bolsas periodontais e nos canais radiculares, de dentes com bolsas periodontais profundas e necrose da polpa, para fins de estabelecimento de um protocolo efetivo de tratamento.

## **Resultados**

Os 10 dentes usados nesse estudo foram provenientes de 10 pacientes. Os dentes apresentavam, sem exceção, bolsas periodontais com profundidade de sondagem maior ou igual à 6mm, lesão no periápice e necrose da polpa. Além disso, eles eram do grupo dos incisivos, caninos, molares e pré-molares. Clinicamente, todos se apresentavam com mobilidade, tendo restaurações ou não (hígidos).

Pelo método do Nested-PCR, o microrganismo mais encontrado nos canais radiculares, na primeira coleta (antes do PQM), foi o *Treponema denticola* (100%, 10/10), seguido de *Porphyromonas gingivalis* (40%, 4/10) e *Tannerella forsythia* (20%, 2/10). Dados na Tabela 1. Após o preparo químico-mecânico, o mais frequente foi: *Tannerella forsythia* (50%, 5/10), seguido de *Treponema denticola* (40%, 4/10) e *Porphyromonas gingivalis* (40%, 4/10). Dados na Tabela 3

Nas bolsas periodontais os valores encontrados foram: *Treponema denticola* (100%, 10/10), seguido de *Tannerella forsythia* (70%, 7/10) e *Porphyromonas gingivalis* (40%, 4/10). Dados na Tabela 1. Após o preparo químico-mecânico: *Treponema denticola* (90%, 9/10), seguido de *Tannerella forsythia* (50%, 5/10) e *Porphyromonas gingivalis* (50%, 5/10). Dados na tabela 3.

	CP 1	CP 2	CE 1	CE 2
<i>Treponema denticola</i>	100% (10/10)	90% (9/10)	100% (10/10)	40% (4/10)
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	40% (4/10)	50% (5/10)	40% (4/10)	40% (4/10)
<i>Tannerella forsythia</i>	70% (7/10)	50% (5/10)	20% (2/10)	50% (5/10)

Tabela 3 - Avaliação das espécies bacterianas *Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis* e *Tannerella forsythia* nas bolsas periodontais (CP) e canais radiculares (CE), antes e depois do PQM, respectivamente

\*CP1: coleta na bolsa periodontal antes do PQM/ CP2: coleta na bolsa periodontal depois do PQM/ CE1: coleta no canal radicular antes do PQM/ CE2: coleta no canal radicular depois do PQM

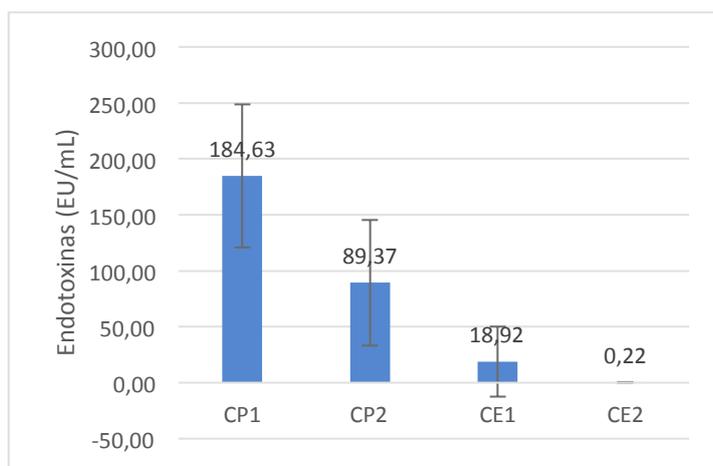
### Quantificação de endotoxinas:

Para a avaliação quantitativa das endotoxinas, foram considerados os 10 dentes e as amostras avaliadas: iniciais (CP1 e CE1) e após PQM (CP2 e CE2) das bolsas periodontais (CP) e dos canais radiculares (CE). Por meio do teste turbidimétrico (LAL) foi observado que o LPS esteve presente em todas as amostras, tanto da bolsa quanto do canal, em todo o tratamento (antes e após o PQM).

Nas coletas iniciais dos canais radiculares, a média do valor de endotoxinas detectada foi de 18,92 EU/mL. Após o PQM, o valor mudou para 0,22 EU/mL, com percentual de redução de 99,43%. Dados no Gráfico 1.

Nas coletas iniciais das bolsas periodontais, a média do valor de endotoxinas detectada foi 184,63 EU/mL. Após o PQM, a média foi de 89,37 EU/mL, com percentual de redução de 72,45 %. Dados no Gráfico 1.

Gráfico 1 - Média e desvio padrão das endotoxinas nos diferentes momentos de coleta (bolsa periodontal antes e depois do PQM e canal radicular antes e depois do PQM)



\*CP1: coleta na bolsa periodontal antes do PQM/ CP2: coleta na bolsa periodontal depois do PQM/ CE1: coleta no canal radicular antes do PQM/ CE2: coleta no canal radicular depois do PQM Gráfico 1 - Média e desvio padrão das endotoxinas nos diferentes momentos de coleta (bolsa periodontal antes e depois do PQM e canal radicular antes e depois do PQM)

## Discussão / Conclusões

A literatura científica é bastante robusta, no que concerne ao estudo do conteúdo microbiológico e endotóxico das patologias endodônticas (Gomes et al., 2004, 1996 a,b,c, 2007; Siqueira et al. 2003 a,b 2009; Brito et al., 2012; Nóbrega et al., 2013; Herrera et al., 2016) e periodontais (Slots, 1986; Haffajee et al., 1984; Socransky et al., 1988, Dahlén et al., 1992; Paster et al., 2001, 2006; Casarin et al., 2013; Dahlen et al., 2019), separadamente. Entretanto, a escassez de trabalhos, voltados à análise de microrganismos periodontopatogênicos e de seus fatores de virulência, em canais radiculares e bolsas periodontais, nos dentes com lesões endodônticas-periodontais combinadas foram fatores motivacionais para o desenvolvimento desse estudo. O predomínio de periodontopatógenos, como os que compõe o Complexo Vermelho, nas patologias pulpares e periodontais é subestimado, se analisados por métodos tradicionais de cultivo microbiológico, devido à alta exigência dos mesmos com relação aos requerimentos nutricionais e gasosos. Por isso a grande importância dos métodos moleculares mais sensíveis, para a detecção de bactérias de difícil cultivo, como as espécies do gênero *Treponema* ssp. (Conrads et al., 1997; Gonçalves eamp; Mouton, 1999; Siqueira et al., 2000a; Siqueira et al., 2000b, Berber, 2009; Gomes et al., 2015).

*Treponema denticola*, *Tannerella forsythia* e *Porphyromonas gingivalis* são bactérias anaeróbias Gram-negativas, e a notória importância das mesmas, dentro das doenças endodônticas e periodontais, é justificada pela presença do lipopolissacarídeo bacteriano, presente da membrana externa, da parede celular, das bactérias Gram-negativas (Seltzer eamp; Farber, 1994; Nissan et al., 1995; NelsonFilho et al., 2002; Oliveira et al., 2005; Pereira, 2011; Herrera et al., 2016).

Diante do exposto, o intuito deste trabalho foi analisar a suscetibilidade das bactérias do Complexo Vermelho aos procedimentos químicos-mecânicos, em 10 canais radiculares e 10 bolsas periodontais de dentes com lesões endo-periodontais combinadas, através do Nested-PCR e investigar os efeitos do PQM na redução dos níveis endotóxicos, através da quantificação de LPS, presentes nas amostras coletadas de ambos os sítios.

Através do método Nested-PCR, pudemos observar que a espécie *Treponema denticola* foi a mais frequentemente detectada, nas bolsas periodontais, antes (100% - 10/10) e após o PQM (90% - 9/10). Resultados semelhantes foram encontrados no estudo de Berber, 2009, em que a espécie esteve presente em 75% das amostras iniciais das bolsas periodontais e em 80% das amostras coletadas após o PQM.

Chapola, 2017 demonstrou que a mesma espécie também foi a mais frequentemente detectada, nas bolsas periodontais, antes do PQM, e que após o mesmo, as três espécies do Complexo Vermelho foram igualmente prevalentes (71,4%). O predomínio de *Treponema denticola*, dentre as espécies integrantes do Complexo Vermelho, nas bolsas periodontais, pode ser explicado devido à forma helicoidal que as bactérias do gênero espiroquetas possuem, o que confere a elas a capacidade de adentrarem-se nos tecidos periodontais mais profundos (Rôças et al., 2003; Siqueira eamp; Rôças, 2003; Foschi et al., 2005; Montagner et al., 2010).

*Treponema denticola* esteve presente em 100% dos casos iniciais nas bolsas periodontais e nos canais radiculares. Semelhantemente, *Porphyromonas gingivalis*, foi encontrada em 40% dos casos iniciais, em ambos os sítios.

Esses resultados sugerem que as vias de comunicação, entre polpa e periodonto, podem ser importantes fatores etiopatogênicos, envolvidos no desenvolvimento e manutenção das lesões endo-periodontais (Berber, 2009; Gomes et al., 2015; Chapola, 2017, Duque et al., 2018).

Com relação à concentração de endotoxinas, inicialmente ao PQM, nas bolsas periodontais, apresentou valores elevados, fato que pode ser explicado devido à maior prevalência de Gram-negativos, em bolsas periodontais profundas (Paster et al., 2000; Mineoka et al., 2008; Liu et al., 2012; Suzuki et al., 2014; Puig-Silla et al., 2016). Após o PQM, foi observado uma redução de 72,45% desses níveis, o que novamente enfatiza a grande relevância que as vias de comunicação anatômica possuem, dentro das lesões endo-periodontais combinadas.

Paralelamente a isso, existem estudos que defendem a neutralização do LPS, pelo uso da clorexidina, que é uma bisbiguanida anfipática (Zorko, Jerela, 2008).

Um dos critérios de inclusão para este estudo foi dentes que apresentassem condição pulpar necrótica, por isso, a média inicial encontrada nos canais radiculares, apresentou valor relativamente alto (18,92 EU/mL). Esses dados corroboram com Chapola, 2017, que, estudando o conteúdo microbiológico e endotóxico das lesões endo-periodontais combinadas, antes e após as diferentes etapas do tratamento endodôntico, obteve um valor médio inicial, nos CR's, de 15,6 EU/mL. Após os procedimentos biomecânicos de desinfecção dos canais radiculares, a média da concentração de endotoxinas apresentou valor praticamente nulo (0,22 EU/mL), ou seja, houve uma redução de 99,43% em comparação com a média inicial, dados que corroboram com os estudos prévios da literatura (Safavi; Nichols, 1993; Silva et al., 2002; Nelson Filho et al., 2002; Signorreti, 2009; Marinho et al., 2015; Chapola, 2017).

Assim, pudemos concluir que *Treponema denticola* foi a espécie do Complexo Vermelho mais prevalente nas bolsas periodontais, antes e após o preparo químico mecânico; O PQM foi capaz de alterar a carga microbiana tanto nos canais radiculares quanto nas bolsas periodontais; E o PQM reduziu o nível das endotoxinas nos canais radiculares e nas bolsas periodontais dos dentes analisados.