



AVALIAÇÃO DO PERFIL MICROBIOLÓGICO DE PACIENTES COM PERIODONTITE CRÔNICA E ENVOLVIMENTO ENDODONTICO SECUNDÁRIO SUBMETIDOS À TERAPIA ENDODONTICA

Palavras-Chave: Endodontia, bactérias, lesões endo-perio.

Autores/as:

Nathalia Reiche Moreira [FOP UNICAMP]

Lidiane Mendes Louzada [FOP UNICAMP]

Rodrigo Arruda-Vasconcelos [FOP UNICAMP]

Prof.^a Dr.^a Brenda Paula Figueiredo De Almeida Gomes (Orientadora) [FOP UNICAMP]

INTRODUÇÃO:

A doença periodontal é considerada a principal causa de perda dentária em adultos, tendo sido associada com doenças sistêmicas, como doenças cardiovasculares, diabetes mellitus tipo 2, resultados adversos da gravidez e osteoporose. A doença periodontal de longa duração pode provocar alterações pulpares (Kwon et al. 2013). Por essa razão a terapia endodôntica tem sido sugerida e indicada em casos nos quais a doença periodontal não responde à terapia (Simring & Goldberg, 1964; Duque et al. 2019). Além disso, o tratamento endodôntico pode favorecer o reparo dos tecidos periodontais doentes (Blonlöf et al. 1988; Stashenko et al. 1991).

As lesões endoperiodontais, também conhecidas como lesões endoperio, são caracterizadas por alterações patológicas com envolvimento pulpar e periodontal em um mesmo dente (Solomon et al. 1995; Al-Fouzan, 2014; Gomes et al. 2015; Duque et al. 2019). São lesões resultantes de produtos inflamatórios encontrados nos tecidos periodontal e pulpar. Diante da presença de necrose pulpar é de senso comum que o tratamento endodôntico deve ser realizado com o objetivo de promover reparo periodontal mesmo nos casos em que a terapia periodontal já tenha sido iniciada (Kwon et al. 2013). Por outro lado, o envolvimento endodôntico secundário, ou seja, com presença de vitalidade pulpar, o tratamento endodôntico tem sido sugerido e indicado em casos em que a doença periodontal não responde à terapia (Simring & Goldberg, 1964; Duque et al. 2019). Nestes casos, a realização de um tratamento endodôntico de alta qualidade, em termos de instrumentação e irrigação é essencial para obtenção de altas taxas de sucesso do tratamento em geral (Vianna et al. 2007; Gomes et al. 2009b; Gomes et al. 2012; Marinho et al. 2015; Barbosa-Ribeiro et al. 2016; Duque et al. 2019).

Atualmente, acredita-se que a utilização de uma medicação intracanal possa servir como um reservatório com capacidade de atuação nas bolsas periodontais, alterando assim o perfil microbiológico e endotóxico nestes sítios (Duque et al. 2019). Desta maneira, é de grande contribuição para a literatura a realização do monitoramento microbiológico nas diversas etapas do tratamento endodôntico de pacientes submetidos à terapia endodôntica com doença periodontal crônica e envolvimento endodôntico secundário, com o objetivo de verificar uma possível melhora no quadro clínico periodontal após o tratamento endodôntico.

Apesar de existir uma extensa literatura quanto à microbiota associada a lesões periodontais, e a lesões endodônticas separadamente, poucos estudos se dedicaram a investigação da microbiota de lesões combinadas, ou seja, de lesões endoperiodontais (LEP), particularmente de dentes com doença periodontal crônica e envolvimento endodôntico secundário. Dessa forma, o presente estudo clínico tem por objetivo caracterizar o perfil microbiológico de pacientes submetidos à terapia endodôntica com doença periodontal crônica tanto nas bolsas periodontais como nos canais radiculares dos dentes envolvidos nas três diferentes etapas do tratamento endodôntico (antes do preparo químico-mecânico (PQM), após o PQM e após 30 dias de medicação intracanal (MIC).

METODOLOGIA:

Autorização para a realização da pesquisa

Este estudo está aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP (CAAE 86140218.0.0000.5418).

Local da pesquisa

Clínica da Pós-graduação e Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas FOP/UNICAMP.

Critério de Inclusão e exclusão

Critério de inclusão: a) Tratamento e acompanhamento periodontal prévio de no mínimo 6 meses a 1 ano. b) Mesmo após esse período de terapia periodontal, os dentes (molares, pré-molares, caninos e incisivos) apresentando pelo menos uma face do dente comprometida com bolsas periodontais iguais ou maiores que 6 mm. c) Dentes que radiograficamente apresentaram perda óssea extensa em uma das faces proximais, acompanhado ou não de sinais e sintomas clínicos. d) Dentes que clinicamente, através do teste térmico a frio e do teste elétrico, apresentaram resposta positiva ao teste de sensibilidade pulpar comparado ao dente contralateral (controle). e) Dentes que durante a terapia periodontal não apresentaram nenhum tipo de resposta positiva à terapia, e a profundidade das bolsas aumentam gradativamente. f) Pacientes que não faziam uso

de anti-inflamatórios sistêmicos, antibióticos sistêmicos e/ou locais ou agentes imunossupressores nos últimos 3 meses.

Critério de exclusão: Foram descartados deste estudo, pacientes que apresentaram dentes com grandes extensões de cárie, com câmara pulpar exposta ao meio bucal, com necrose pulpar, com trincas, calcificações, qualquer tipo de reabsorção e casos em que não foi possível acessar todo o comprimento do canal radicular. Pacientes portadores de doenças sistêmicas (como por exemplo, diabetes melitus e AIDS), com história de antibioticoterapia recente e uso de antifúngicos também não participaram deste trabalho.

Aspectos clínicos e radiográficos: Para cada paciente foram registradas informações como: idade, sexo, história médica e dentária. Foram anotados os aspectos físicos do canal durante a coleta da amostra, tais como canal seco, presença de exsudado, presença ou não de cáries e restaurações. Todas as características clínicas e radiográficas, referentes ao dente investigado, foram anotadas na ficha clínica de cada paciente.

Coletas de amostras

Foram coletadas amostras iniciais, após o preparo químico-mecânico e após a medicação intracanal a base de hidróxido de cálcio e clorexidina gel 2% de 10 canais radiculares (CR) e bolsas periodontais (BP) de dentes com lesão periodontal primária com envolvimento endodôntico secundário. As coletas foram realizadas através de cones de papéis absorventes estéreis calibre FM (Dentsply - Petrópolis, RJ). As metodologias relacionadas às coletas e análises das amostras, utilizadas neste trabalho, foram baseadas em estudos prévios (Gomes, 1995; Gomes et al., 1994a,b; 1996, 2004; Gomes 2007, Duque 2019).

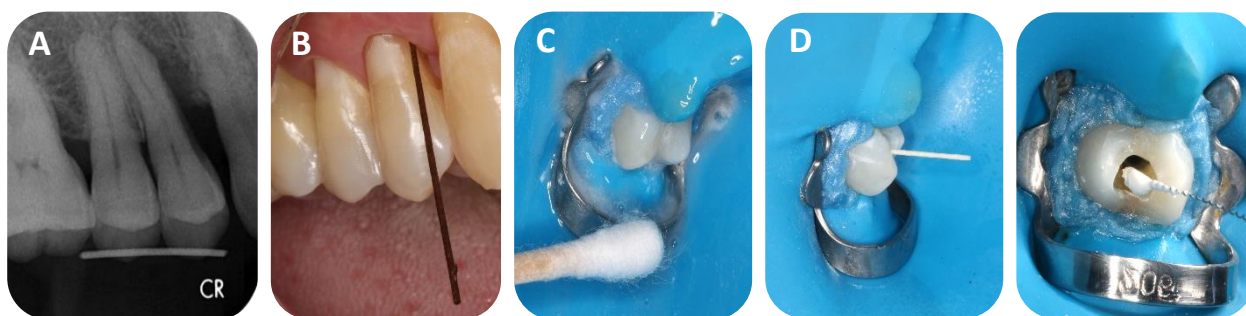


Figura 1. Aspectos clínicos e radiográficos das coletas dos CR E BP. A- Radiografia inicial; B- Sondagem periodontal; C- Desinfecção do campo operatório com H₂O₂ 30% (v/v) seguido de NaOCl 2,5% e de tiosulfato de sódio 5% (por 1 minuto); D- Coleta após o preparo químico-mecânico com cones de papel absorvente estéreis; E- Medicação intracanal à base de hidróxido de cálcio (30 dias).

Procedimentos Laboratoriais

Identificação microbiana pelo método molecular Nested – PCR

Reação de PCR Universal

Extração do DNA bacteriano

As extrações de DNA dos dentes com polpa vital foram realizadas com o QIA amp DNA kit (QYAGEN, Valencia, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante.

O Nested-PCR consiste em duas etapas. As etapas iniciais (FILE 11) do ciclo de PCR compreendem uma desnaturação inicial (95°C, 2 min); 22 ciclos de desnaturação (94°C, 1 min), anelamento (42°C, 2min) e extensão (72°C, 3 min); seguidos de uma extensão final (72°C, 10 minutos).

Produtos da reação da PCR foram analisados pelo gel eletroforético de agarose 1% (Invitrogen® - Life Technology do Brasil) em tampão de Tris-borato EDTA (pH 8,0) (TBE) corado com brometo de etídio (5ug/mL-Invitrogen®, São Paulo, SP, Brasil). Foi incluído em cada gel, um padrão de peso molecular de 100 bp (DNA ladder, Invitrogen® - Life Technology do Brasil). Após o término de cada corrida (60 volts por 40 min), as bandas foram observadas com transiluminador de luz ultravioleta. Uma identificação positiva ou negativa foi baseada na presença de bandas limpas do esperado tamanho da molécula na altura do fragmento.

Verificado o sucesso da reação universal, uma alíquota do produto desta reação foi utilizada para realização de outra reação PCR, agora usando um primer espécie-específico juntamente com o L189R. As espécies investigadas foram: *A. naeslundii*, *E. faecalis*, *P. micros* (*P. micra*), *P. gingivalis*, *T. forsythia* e *T. denticola*.

As etapas finais (FILE 12) do ciclo de PCR compreenderam 27 ciclos de desnaturação (94°C, 1 min), anelamento (52°C, 2min) e extensão (72°C, 3 min). Para essa etapa final foram utilizados os reagentes nas mesmas concentrações da primeira reação FILE 11 e os produtos analisados pelo gel eletroforético de agarose 1 (Figura 2).

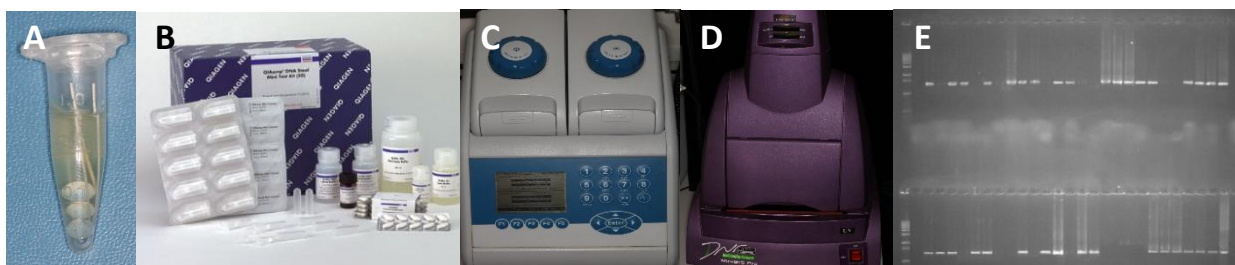


Figura 2. Nested PCR. A- VMGA III; B- Extração de DNA (QIAGEN); C-Termociclador; D- Transiluminador de luz UV; E- Bandas espécie-específicas.

Análise estatística

Os dados coletados foram introduzidos numa planilha de cálculo e estatisticamente analisados usando SPSS for Windows (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA). Os dados referentes ao Nested PCR foram avaliados através do teste de Friedman.

RESULTADOS

As espécies mais prevalentes nas BP foram *E. faecalis*, *T. forsythia*, *P. gingivalis*, *P. micra*, *T. denticola* e *A. naeslundii*. Nos CR houve prevalência de *E. faecalis* e *P. gingivalis*. O tratamento endodôntico promoveu redução microbiana tanto nas BP quanto nos CR após o PQM e após 30 dias de MIC.

CONCLUSÕES:

Concluiu-se que a microbiota das BP e CR é polimicrobiana, com presença de espécies Gram-positivas e Gram-negativas, anaeróbias facultativas e estritas. O PQM e a MIC favoreceram a redução microbiana em ambos os sítios.

BIBLIOGRAFIA

1. Al-Fouzan Khalid. A New Classification of Endodontic-Periodontal Lesions. Int J Dent. 2014; 2014: 919173
2. 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; 42: 552-556
3. Baumgartner JC, Khemaleelakul SU, Xia T. Identification of spirochetes (treponemes) in endodontic infections. J Endod 2003; 29: 794-797.
4. Blonlöf L, Lindskog S, Hammarström L. Influence of pulpal treatments on cell and tissue reactions in the marginal periodontium. J Periodontol. 1988; 59: 577-583.
5. Duque TM, Prado M, Herrera DR, Gomes BPFA. Periodontal and endodontic infectious/inflammatory profile in primary periodontal lesions with secondary endodontic involvement after a calcium hydroxide-based intracanal medication. Clin Oral Investig 2019;23:53-63.
6. Endo MS, Ferraz CC, Zaia AA, Almeida JF, Gomes BP. Quantitative and qualitative analysis of microorganisms in root-filled teeth with persistent infection: Monitoring of the endodontic retreatment. Eur J Dent. 2013; 7: 302-309.
7. Gomes BPFA, Berber VB, Kokaras AS, Chen T, Paster BJ. Microbiomes of Endodontic-Periodontal Lesions before and after chemomechanical preparation. J Endod. 2015; 41: 1975–1984.
8. Gomes BP, Martinho FC, Vianna ME. Comparison of 2.5% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine gel on oral bacterial lipopolysaccharide reduction from primarily infected root canals. J Endod. 2009; 35: 1350-1353b
9. Gomes BP, Endo MS, Martinho FC. Comparison of endotoxin levels found in primary and secondary endodontic infections. J Endod. 2012; 38:1082-1086.
10. Montagner F, Jacinto RC, Signoretti FG, Gomes BP. Treponema Species Detected in Infected Root Canals and Acute Apical Abscess Exudates. J Endod. 2010; 36(11):1796-9.