



ESTUDO DA MICROBIOTA POR MÉTODO MOLECULAR E QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE ENDOTOXINAS NAS DIFERENTES ETAPAS DO TRATAMENTO ENDODÔNTICO EM DENTES COM PULPITE IRREVERSÍVEL

Palavras-Chave: endodontia, pulpite, bactérias

Autores/as:

Beatriz Isabel Nogueira Lemos [FOP/Unicamp]

Rodrigo Arruda-Vasconcelos [FOP/Unicamp]

Lidiane Mendes Louzada [FOP/Unicamp]

Prof.^a Dr.^a Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes [FOP/Unicamp]

INTRODUÇÃO:

Clinicamente, a pulpite pode ser classificada como reversível, quando a eliminação do agente causal permite o tecido pulpar voltar ao estado de normalidade, e irreversível, caracterizada pela exposição do biofilme da lesão cáriosa à polpa, onde o tratamento endodôntico é indicado (Levin et al. 2009, Ricucci et al. 2014, Rôças et al. 2015, 2016). A inflamação do tecido pulpar e, conseqüentemente, sintomatologia, está relacionada à presença de biofilme e a sua profundidade na dentina (Rôças et al. 2015, Zheng et al. 2019).

A endotoxina (LPS) é um componente da membrana externa da parede celular de bactérias Gram-negativas (Rietschel & Brade, 1992). Este fator de virulência apresenta capacidade de invasão dos tecidos periapicais (Rietschel & Brade, 1992), agindo como um dos estímulos mais potentes na resposta imune do hospedeiro, estimulando células imunocompetentes a liberar mediadores químicos inflamatórios (Herrera et al. 2017).

Assim, o presente estudo teve como objetivo investigar a presença de 5 bactérias: *E. faecalis*, *F. nucleatum*, *G. morbillorum*, *P. micros* (*P. micra*) e *P. gingivalis*. E quantificar os níveis de LPS em dentes com pulpite irreversível nas diferentes etapas do tratamento endodôntico.

METODOLOGIA:

O presente estudo foi aprovado pelo **CEP FOP-UNICAMP**: CAAE 86140218.0.0000.5418.

Foram selecionados pacientes com diagnóstico pulpar de pulpite aguda irreversível (n = 10).

Foram incluídos neste estudo pacientes com: dentes com vitalidade pulpar; sintomatologia dolorosa intensa e prolongada aos testes de sensibilidade pulpar (teste térmico-frio); dor espontânea no momento do atendimento; e sem lesão periapical aparente radiograficamente. Os critérios de exclusão foram: uso de antibiótico terapia prévia nos últimos 3 meses; canais expostos a cavidade oral; casos onde o isolamento absoluto não seja possível; casos com doença periodontal avançada; pacientes jovens com histórico de traumatismos dentais recentes; dentes com rizogênese incompleta; dentes com presença de curativos de demora na câmara pulpar tratamentos endodônticos anteriores.

Durante a realização dos procedimentos clínicos, foram utilizadas técnicas assépticas e instrumentos esterilizados e aprotogênicos.

As amostras da dentina infectada foram realizadas através de curetas estéreis que foram armazenados em tubo vazio (LPS) e tubo contendo VMGA III (microbiológica). As amostras dos canais radiculares foram realizadas com cones de papel absorvente estéreis/apirogênicos, que permanecerão em toda a extensão dos canais radiculares, por 4 minutos, sendo 1 para coleta de endotoxinas e 3 para coleta microbiológica, que foram armazenados em tubo vazio e contendo VMGA III, respectivamente. O material proveniente das coletas microbiológicas foi armazenado em freezer a -80°C para análise, de acordo com o cronograma, com o objetivo de poupar recursos humanos e financeiros do laboratório.

Nested – PCR

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. Após extração, a leitura da concentração de DNA presente nas amostras coletadas dos canais radiculares foi realizada a 260 nm através de espectrofotometria (Nanodrop 2000; Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA).

O Nested PCR consiste em duas etapas. As etapas iniciais (FILE 11) do ciclo de PCR compreenderam 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: *E. faecalis*, *F. nucleatum*, *G. morbillorum*, *P. micros* (*P. micra*) e *P. gingivalis*.

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%.

Quantificação dos níveis de endotoxinas

Teste Limulus Amebocyte Lysate (LAL) Pyrogen-5000 (Lonza, Walkersville, MD, EUA)

Para a realização do teste LAL Pyrogen-5000, todos os materiais estavam apirogênicos.

Pyrogen-5000 é um ensaio cinético quantitativo para detecção de endotoxina de bactéria Gram-negativa. Esse teste utiliza uma preparação de Lisado do Amébócito *Limulus* (LAL), em combinação com um incubador fotométrico e um *software* apropriado, para detecção fotométrica da endotoxina. Uma amostra é misturada com o reagente LAL reconstituído, colocada em um fotômetro e monitorada automaticamente até o desenvolvimento de uma aparência de turvação (densidade ótica). O tempo necessário antes da aparição da turvação (tempo de reação) é inversamente proporcional a quantidade de endotoxina presente. A concentração de endotoxina em amostras desconhecidas pode ser calculada a partir de uma curva-padrão.

Para o cálculo da concentração de endotoxina em amostras desconhecidas foi estabelecida uma curva-padrão com quantidades conhecidas de endotoxina (*Escherichia coli*). Esta foi preparada utilizando soluções com concentrações 0,01 EU/mL, 0,10 EU/mL, 1 EU/mL, 10 EU/mL, 100 EU/mL.

Os valores da absorbância das soluções de endotoxina previamente preparadas foram espectrofotometricamente medidos a 340 nm no leitor Biotek (ELX 808, Winooski, VT, EUA). A absorbância a 340 nm devia ser linear com os intervalos de concentração usados. A linearidade da curva padrão dentro do intervalo de concentração será usada para determinar os valores de endotoxina. A reprodutibilidade foi verificada pela comparação das diferentes curvas.

Cálculo da concentração de endotoxinas

De forma contínua durante todo o ensaio, o leitor de microplacas foi monitorado na absorbância de 340 nm de cada poço da microplaca. Usando a leitura de absorbância inicial de cada orifício como seu próprio branco, o leitor determina o tempo necessário para que a absorbância aumente a 0,03 unidades. Este tempo é denominado tempo de reação. O *software* WinKQCL (Lonza, Walkersville, MD, EUA) executa automaticamente uma correlação linear log/log do tempo de reação de cada padrão com a concentração de endotoxina correspondente. Os parâmetros da curva padrão foram impressos no relatório. Se o valor absoluto do coeficiente de correlação (r) for $\geq 0,980$, um modelo polinomial pode ser usado para construir uma curva padrão e, assim, prever as concentrações de endotoxina das amostras de teste.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

As espécies mais prevalentes na dentina infectada (DI) foram *E. faecalis*. Já as espécies mais prevalentes nos canais radiculares (CR) (C1) foram *F. nucleatum* e *E. faecalis*, como podemos observar na Figura 1.

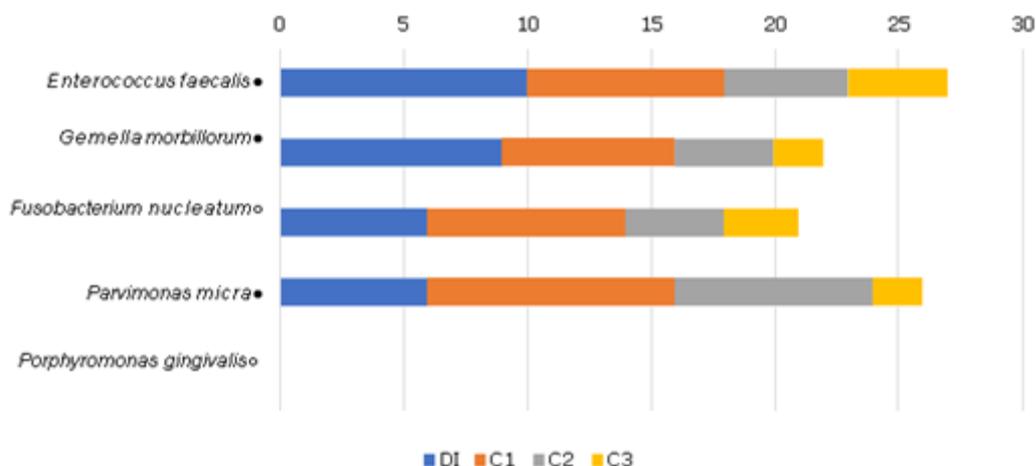


Figura 1. Espécies bacterianas investigadas através da técnica molecular Nested PCR na cárie dental e canais radiculares nas diferentes etapas do tratamento endodôntico em dentes com pulpite irreversível.

O tratamento endodôntico promoveu redução microbiana, entretanto, espécies resistentes persistiram mesmo após medicação intracanal (MIC).

Os níveis de LPS foram maiores na DI 42,52 (± 8.11) EU/mL comparado aos CR (C1) 0,44 (± 0.03) EU/mL ($P < 0.05$), como descrito na Tabela 1. O PQM promoveu redução significativa nos níveis de LPS 0,05 (± 0.01) EU/mL ($P < 0.05$), o que não foi observado após a MIC ($P > 0.05$).

Tabela 1. Média ($\pm DP$) dos níveis de endotoxinas (EU/ml) na cárie e canais radiculares nas diferentes etapas do tratamento endodôntico em dentes com pulpite irreversível.

Etapa do Tratamento Endodôntico				
	DI	C1	C2	C3
LPS	42.52 (± 8.11) ^a	0.44 (± 0.03) ^b	0.05 (± 0.01) ^c	0.04 (± 0.01) ^c

DI: Dentina infectada; C1: Coleta antes do prepare químico-mecânico; C2: Coleta após prepare químico-mecânico. C3: coleta após medicação intracanal, LPS: lipopolissacarídeos (endotoxinas). *Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$). ANOVA de medidas repetidas.

CONCLUSÕES:

O presente estudo conclui que o tratamento endodôntico é eficaz na redução de espécies microbianas e dos níveis de LPS de dentes com PI.

BIBLIOGRAFIA

BARBOSA-RIBEIRO, M. et al. **Quantification of Lipoteichoic Acid Contents and Cultivable Bacteria at the Different Phases of the Endodontic Retreatment.** J Endod 2016a; 42: 552-556.

HERRERA, D. R. et al. **Clinical efficacy of EDTA ultrasonic activation in the reduction of endotoxins and cultivable bacteria.** Int Endod J 2017; 50: 933-940.

LEVIN, L.G. et al. **Identify and Define All Diagnostic Terms for Pulpal Health and Disease States.** J Endod 2009; 35: 1645-1657.

RICUSSI, D., LOGHIN, S., SIQUEIRA, Jr. J. F. **Correlation between Clinical and Histologic Pulp Diagnoses.** J Endod 2014; 40: 1932-1939.

RIETSCHEL, E.T., BRADE, H. **Bacterial endotoxins.** Scient Am 1992; 267: 54-61.

RÔÇAS, I.N. et al. **Advanced Caries Microbiota in Teeth with Irreversible Pulpitis.** J Endod 2015; 41: 1450-1455.

RÔÇAS I. N. et al. **Microbiome of Deep Dentinal Caries Lesions in Teeth with Symptomatic Irreversible Pulpitis.** Plos One 2016, 11: 1-13.

ZHENG, J. et al. (2019) **Microbiome of deep dentinal caries from reversible pulpitis to irreversible pulpitis.** Journal of Endodontics 45, 302-309.e1.