Identificação de *Candida albicans* e *Enterococcus faecalis* em canais radiculares de dentes indicados ao retratamento endodôntico

Palavras-Chave: *Candida albicans, Enterococcus faecalis,* Retratamento, Reação em cadeia da polimerase

Autoras:
BIANCA LIMA DE ARAÚJO [FOP/UNICAMP]
Prof.ª Dr.ª BRENDA PAULA FIGUEIREDO DE ALMEIDA GOMES (orientadora) [FOP/UNICAMP]

INTRODUÇÃO:

O insucesso do tratamento endodôntico pode estar associado à prevalência de alguns microrganismos resistentes, como *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*. A sua prevalência pode ocorrer por falhas nas etapas do tratamento endodôntico ou a uma complexa anatomia dos canais radiculares. A falha do selamento coronário, que permite a penetração de microrganismos via microinfiltração, também podem ser um importante fator etiológico.

A *Candida albicans* e o *E. faecalis* parecem conseguir utilizar a seu favor a remoção de outros microrganismos, conseguindo viver em um meio pobre em nutriente, como o canal do dente tratado endodonticamente (Sundqvist *et al.*, 1998), estando ambos associados aos casos de insucesso do tratamento endodôntico (Molander e Dahlén, 2003) e persistência das condições patológicas perirradiculares (Gomes *et al.*, 2004; Rôças *et al.*, 2004; Sirén *et al.*, 2004).

Compreender a composição da microbiota do canal radicular infectado é essencial para melhorar as estratégias de tratamento para controle de infecções e eliminação de agentes patogênicos, bem como para prevenir reinfecções e lesões periapicais. Portanto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a presença dos dois microrganismos resistentes nos canais radiculares de dentes com lesão periapical e de dentes sem lesão periapical, porém indicados ao retratamento endodôntico por motivos protéticos, sendo analisados através do método molecular PCR (reação em cadeia da polimerase).

METODOLOGIA:

Comitê de Ética e Pesquisa em Voluntários Humanos da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Piracicaba, SP, Brasil: protocolo número CAAE 86140218.0.0000.5418.

População de estudo e Coleta: Foram selecionados pacientes (n = 24), na qual foram utilizadas 12 amostras dos canais radiculares de dentes que apresentavam lesão periapical e 12 amostras dos canais radiculares de dentes que não apresentavam lesão periapical, mas que estavam sendo retratados por motivos protéticos, respeitando os critérios de inclusão (tabela 1). Durante a fase da coleta, 2 amostras tiveram que ser excluídas pois atingiram os critérios de exclusão durante as sessões do retratamento endodôntico (critérios de exclusão na tabela 2).

Na realização dos procedimentos clínicos, foram utilizados instrumentos esterilizados apirogênicos, iniciando pela descontaminação da face externa do paciente com solução de clorexidina

a 2%, seguido por anestesia local, polimento coronário com pedra pomes e água remoção de contaminantes coronário, realização da descontaminação do campo operatório e o isolamento absoluto e selamento da interface coroa dental/lençol de borracha com cianocrilato (Super Bonder, Loctite, SP, Brasil) com o objetivo de prevenir infiltração salivar. Foi feita a abertura coronária com irrigação de solução fisiológica estéril. Nos casos de retratamento por motivos protéticos, a remoção da guta percha foi feita sem utilização de solventes ou substâncias químicas auxiliares, utilizando lima Reciproc R25 (VDW, Munich, Germany).

Para as coletas endodônticas, foram utilizados um total de 3 cones de papel absorvente apirogênicos de calibre FM (Dentsply, RJ, Brasil) introduzidos um a um no comprimento total do canal, permanecendo por 1 minuto cada um. Após, os cones são transferidos para tubos do tipo eppendorfs previamente esterilizados, contendo 1,0 mL do meio de transporte pré-reduzido VMGA III – Viability Medium Goteberg Agar (Dáhlen *et al.*, 1993). Após, os eppendorfs foram congelados em freezer na temperatura de - 80°C para futuras análises.

Tabela 1: Critérios de inclusão dos casos para as amostras.

- dentes tratados endodonticamente, sendo a presença de tratamento endodôntico prévio confirmada radiograficamente;
- com diagnóstico de periodontite apical crônica seguindo os critérios de Gutmann *et al.*, 2009;
- livres de qualquer alteração periapical, indicados a reintervenção por motivos exclusivamente protéticos;
- aqueles que apresentavam boas condições de saúde (classificação I ou II da American Society of Anesthesiologists);
- que não tinham passado por antibioticoterapia prévia nos últimos 3 meses;
- com ausência de doença periodontal avançada e que não apresentassem bolsas periodontais com profundidade superior a 4 mm;
- dentes com rizogênese completa;
- sem histórico de traumatismos dentário.

Tabela 2: Critérios de exclusão das amostras durante a coleta

- pacientes que não se apresentaram para as etapas do tratamento endodôntico nas datas estabelecidas;
- dentes portadores de infecções endodônticas primárias;
- dentes que impossibilitaram o isolamento absoluto;
- dentes que sofreram fraturas coronárias e/ou radiculares;
- dentes sem restauração ou que perderam selamento coronário entre as consultas.

Após as coletas, os tratamentos endodônticos foram concluídos, sendo feito o preparo químico-mecânico com clorexidina 2% gel como substância química auxiliar e irrigação com soro fisiológico 0,9% e agitação final com 3 ml de EDTA 17% no interior do canal radicular. Caso o dente estivesse assintomático e sem presença de exsudato, a obturação poderia ser feita na mesma sessão. Caso contrário, foi feito a medicação intracanal a base de hidróxido de cálcio e clorexidina 2% gel, que permaneceu no interior do canal por 7 dias, para posterior obturação.

Extração do DNA bacteriano e fúngico: As extrações de DNA das amostras de canais radiculares e dos controles positivos (*C. albicans* e *E. faecalis*) foram realizadas com o QIAamp DNA kit (QYAGEN, Valencia, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Após extração, foram realizados testes para quantificar o material genético e a leitura da concentração de DNA a 260 nm através de espectrofotometria (Nanodrop 2000; Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA).

Detecção de *Candida albicans* por meio de Nested PCR: O Nested-PCR consiste em duas amplificações:

• Na Primeira amplificação (1ª PCR), foi utilizado os primers Yeast universal (Haynes; Westerneng, 1996) que amplificaram um fragmento de 600-640 pares de base. As condições de amplificação, bem como as etapas de ciclagem, foram realizadas como o descrito por Haynes e Westerneng (1996).

• Na Segunda amplificação, o fragmento resultante desta etapa foi submetido a 2ª PCR, uma Semi-Nested, na qual manteve-se o primer R (637-654 bp), e acrescentou-se o primer F correspondente a espécie de *Candida*. O uso de primers foram distintos para cada variante, permitindo a diferenciação por meio de diferentes tamanhos de fragmentos, possibilitando assim a genotipagem de fungos em dados metagenômicos.

Os produtos da reação do PCR foram analisados pelo gel eletroforético de agarose 1% (Invitrogen® - Life Technology do Brasil) em tampão de Tris-borato EDTA (pH 8,0) (TBE), corados com brometo de etídio (5ug/mL-Invitrogen®, São Paulo, SP, Brasil), com um padrão de peso molecular de 1Kb (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. A identificação positiva ou negativa foi baseada na presença de bandas íntegras correspondente ao peso molecular esperado. Os controles positivos das reações foram compostos por cepas de referência de *Candida albicans*, adquiridas da American Type Culture Collection (ATCC, Baltimore, MD, EUA).

Detecção de *Enterococcus faecalis* por meio de Nested PCR: O Nested-PCR consiste em duas amplificações:

- Primeira amplificação: A região que abrange o gene 16S e 23S rRNA foi amplificada através dos Primers Universais abaixo listados:

  Univ Forward (785) 16S 5' GGATTAGATACCCTGGTAGTC 3'

  Univ Reverse (L422) 23S 5' GGAGTATTTAGCTT 3'

  A primeira amplificação das amostras foi processada para volume final de 50 µL para cada amostra contendo: 5 µL de tampão para reação de PCR (10x Reaction Buffer, Invitrogen, São Paulo, São Paulo, Brasil); 5µL de uma mistura de deoxiribonucleotídeos fosfatados (2mM) (dNTPs, Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil); 6 µL de solução de cloreto de magnésio (25 mM) (MgCl2, Invitrogen, São Paulo, São Paulo, Brasil); 1,25 µL de uma solução 100 µM de Primer Forward (20 mM) (Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil); 1,25 µL de uma solução 100 µM de Primer Reverse (20 mM) (Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil); 29,3 µL de água ultrapura livre de DNAase e RNAase; 0,25 µL da enzima Taq DNA Polimerase (Taq Platinum, Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil) e 2 µL de DNA extraído da amostra coletada do canal radicular.

  As etapas iniciais da Primeira Amplificação (FILE 11) do ciclo de PCR compreendeu 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).

- Segunda amplificação: Foi utilizado o primer específico (16S) + L189 R (23S). O produto da primeira reação foi utilizado na segunda reação de PCR, agora usando um primer espécie-específico forward (16S), juntamente com o L189R (23S).

Os 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), corados com brometo de etídio (5 ug/mL - Invitrogen®, São Paulo, SP, Brasil), com 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. A identificação positiva ou negativa foi baseada na presença de bandas íntegras e com tamanho e peso molecular esperado. Os controles positivos das reações foram compostos por cepas *E. faecalis* referência, adquiridas da American Type Culture Collection (ATCC, Baltimore, MD, EUA).

Análise estatística: Os dados coletados foram tabulados em uma planilha de cálculo e analisados estatisticamente usando SPSS for Windows (SPSS Inc., Chicago, ILL, USA). A estatística descritiva foi aplicada e a frequência absoluta e a relativa foram calculadas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Foram detectados *Candida albicans* e *Enterococcus faecalis* em 100% dos casos de canais radiculares com necessidade de retratamento por presença de lesão periapical e por motivos protéticos sem presença de lesão periapical (tabela 3). Já nos casos de canais radiculares com necessidade de retratamento por motivos protéticos sem presença de lesão periapical, foram detectados *Candida albicans* e *Enterococcus faecalis* em 30% e 60%, respectivamente (tabela 4).

Tabela 3 - Prevalência *de C. albicans* e *E. faecalis* nas amostras de canais radiculares com necessidade de retratamento com lesão periapical

Amostras com lesão	*C. albicans*	*E. faecalis*
1	1*	1*
2	1	1
3	1	1
4	1	1
5	1	1
6	1	1
7	1	1
8	1	1
9	1	1
10	1	1
11	1	1
12	1	1

***1**: presença do microrganismo; 0: ausência do microrganismo

Tabela 4 - Prevalência *de C. albicans* e *E. faecalis* nas amostras de canais radiculares com necessidade de retratamento por motivos protéticos sem lesão periapical.

Amostras sem lesão	*C. albicans*	*E. faecalis*
1	0*	1*
2	0	1
3	0	1
4	1	0
5	0	1
6	0	0
7	0	1
8	1	0
9	1	0
10	0	1
11	-**	-**
12	-	-

***1**: presença do microrganismo; 0: ausência do microrganismo
** -: amostras que atingiram os critérios de exclusão

A prevalência de 100% de *C. albicans* nos casos de insucesso do tratamento endodôntico por presença de lesão periapical discorda dos resultados comumente observados na literatura. Rôças, Hülsmann e Siqueira (2008), usando o método de PCR, obtiveram uma prevalência de 6% (1/17) de *Candida albicans* nas amostras de casos de insucesso do tratamento endodôntico com presença de lesão periapical. Já Delboni (2009), em sua pesquisa, isolou *C. albicans* em 1 (2,4%) caso nos 42 canais radiculares de dentes com insucesso do tratamento endodôntico. Vale destacar que poucos trabalhos investigam a prevalência de *C. albicans* em casos de retratamento endodôntico por motivos protéticos sem lesão periapical usando o método molecular de Nested-PCR.

E. faecalis foi encontrado em todas as amostras do presente estudo, demonstrando uma alta prevalência dessa bactéria nos casos de retratamento com e sem presença de lesão periapical. Essa informação converge com os resultados obtidos Gomes *et al.* (2006), que investigaram a presença de E. faecalis em 50 canais radiculares de dentes com infecção primaria e em 50 canais de dentes com infecção secundária, através da cultura e PCR. No PCR, detectou-se esta espécie em 41 (82%) casos com infecção primaria e em 38 (76%) dos 50 casos com infecção secundaria. Bicego-Pereira *et al.* (2020) também detectou *E. faecalis* em 13 das 20 amostras coletadas de canais radiculares indicados ao retratamento endodôntico por motivo protético.

Nossos resultados utilizando PCR mostraram ser alta a prevalência de *E. faecalis* e de *C. albicans* nos canais radiculares de dentes com insucesso do tratamento endodôntico com e sem lesão periapical. Tal fato pode indicar uma grande resistência destes microrganismos ao tratamento endodôntico e que a microinfiltração coronária pode favorecer a entrada destes no interior do canal radicular.

CONCLUSÕES:

De acordo com os resultados obtidos, é possível concluir que os canais radiculares de dentes com insucesso do tratamento endodôntico têm uma alta prevalência de *E. faecalis* e *C. albicans* no interior dos canais radiculares em comparação dos canais sem lesão periapical.

Apoio: FAPESP 2015/23479-5, CNPq 303852/2019-4, CAPES Finance Code 001, PIBIC.

BIBLIOGRAFIA

BICEGO-PEREIRA EC, BARBOSA-RIBEIRO M, DE-JESUS-SOARES A, ZAIA AA, FERRAZ CCR, ALMEIDA JFA, *et al.* Evaluation of the presence of microorganisms from root canal of teeth submitted to retreatment due to prosthetic reasons and without evidence of apical periodontitis. **Clin Oral Investig**, v. 24(9), p. 3243-3254, 2020.

DAHLÉN G, PIPATTANAGOVIT P, ROSLING B, MÖLLER AJ. A comparison of two transport media for saliva and subgingival samples. **Oral Microbiol Immunol**, v. 8(6), p. 375-382, 1993.

DELBONI, MG. Identificação dos microrganismos presentes na saliva, na coroa dental e no canal radicular de dentes indicados ao retratamento endodôntico e análise da suscetibilidade antimicrobiana, dos fatores de virulência e da diversidade genética dos Enterococcus **[tese]**. Piracicaba: Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, 2009.

GOMES BP, PINHEIRO ET, GADÊ-NETO CR, SOUSA EL, FERRAZ CC, ZAIA AA, *et al.* Microbiological examination of infected dental root canals. **Oral Microbiol Immunol**, v. 19(2), p. 71-76, 2004.

GOMES BP, PINHEIRO ET, SOUSA EL, JACINTO RC, ZAIA AA, FERRAZ CC, *et al. Enterococcus faecalis* in dental root canals detected by culture and by polymerase chain reaction analysis. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 102(2), p. 247-253, 2006.

HAYNES KA, WESTERNENG TJ. Rapid identification of *Candida albicans*, *C. glabrata, C. parapsilosis* and *C. krusei* by species-specific PCR of large subunit ribosomal DNA. **J Med Microbiol**, v. 44(5), p. 390-396, 1996.

MOLANDER A, DAHLÉN G. Evaluation of the antibacterial potential of tetracycline or erythromycin mixed with calcium hydroxide as intracanal dressing against *Enterococcus faecalis* in vivo. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 96(6), p. 744-750, 2003.

Rôças IN, Hülsmann M, Siqueira JF Jr. Microorganisms in root canal-treated teeth from a German population. **J Endod**, v. 34(8), p. 926-931, 2008.

RÔÇAS IN, SIQUEIRA JF JR, SANTOS KR. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. **J Endod**, v. 30(5), p. 315-320, 2004.

SIRÉN EK, HAAPASALO MP, WALTIMO TM, ØRSTAVIK D. In vitro antibacterial effect of calcium hydroxide combined with chlorhexidine or iodine potassium iodide on *Enterococcus faecalis*. **Eur J Oral Sci,** v. 112(4), p. 326-331, 2004.

SUNDQVIST G, FIGDOR D, PERSSON S, SJÖGREN U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod,** v. 85(1), p. 86-93, 1998.