

IDENTIFICAÇÃO DE *STREPTOCOCCUS MUTANS* E *CANDIDA ALBICANS* EM DENTES COM PULPITE IRREVERSÍVEL

Palavras-Chave: ENDODONTIA, MICRORGANISMOS, PCR

Autores/as:

Aline Vitória de Souza Nogueira- FOP UNICAMP

Rodrigo Arruda-Vasconcelos – FOP UNICAMP

Lidiane Mendes Louzada – FOP UNICAMP

Prof.^a Dr.^a Brenda PFA Gomes – FOP UNICAMP

INTRODUÇÃO:

A cavidade bucal é composta por uma grande variedade de espécies microbianas (Dewhirst et al. 2010, Jiang et al. 2014) que naturalmente habitam este microambiente. Entretanto, o desequilíbrio, tais como, alterações do pH, redução no fluxo salivar ou aumento do número de bactérias, pode favorecer à formação da cárie dental (Marsh 1994, 2006, Sheiham & James 2015).

Estudos têm mostrado a presença de diferentes espécies microbianas em lesões cariosas, dentre elas, destacam-se bactérias dos gêneros *Actinomyces* spp., *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp., *Propionibacterium* spp., *Streptococcus* spp. e *Veillonella* spp. (Gross et al. 2012, Rôças et al. 2016, Pitts et al. 2017). Além disso, a presença de *Candida albicans*, espécie de fungo comumente detectada na cavidade bucal de indivíduos saudáveis e com implicação em doenças da mucosa bucal, tem sido associada a cárie dental (Carvalho et al. 2006, Ugun Can et al. 2007, Klinke et al. 2011).

No contexto das infecções endodônticas, a cárie é o principal fator etiológico das alterações pulpares (Bergenholtz 1981). De acordo com a *American Association of Endodontists* (AAE, 2013), a pulpíte pode ser classificada em reversível ou irreversível, podendo esta última ser

de natureza sintomática ou assintomática. Desta maneira, diversas espécies bacterianas identificadas em cáries profundas também são detectadas em infecções endodônticas (Munson et al., 2002; Sakamoto et al., 2006; Aas et al., 2008; Siqueira & Rôças, 2009; Santos et al., 2011; Gross et al., 2012; Schulze-Schweifing et al., 2014; Rôças et al., 2016). Estudo recente mostrou, a partir de amostras coletadas, que a carie dental profunda e canais radiculares de dentes com pulpíte irreversível apresentam similaridade (Arruda-Vasconcelos et al. 2021).

Streptococcus mutans é uma das principais espécies microbianas associadas à cárie dental. *S. mutans* apresenta alta capacidade de formação de biofilme, além de tolerar condições adversas, tais como, baixo pH (Lima et al. 2021). *Candida albicans* é uma espécie fúngica comumente detectada em lesões cariosas em pacientes jovens e idosos, mais comumente relacionada à cárie na superfície radicular e/ou próxima ao sulco gengival (Shen et al. 2005, Zaremba et al. 2006). Desta maneira, o objetivo deste estudo é investigar a presença de *Streptococcus mutans* e *Candida Albicans* em amostras clínicas da cárie dental e canais radiculares de dentes com diagnóstico de pulpíte irreversível através do método molecular PCR (reação em cadeia da polimerase).

METODOLOGIA:

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (protocolo número CAAE 86140218.0.0000.5418) da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Piracicaba, SP, Brasil. Todos os pacientes assinaram um termo de consentimento informado antes de sua participação. O registro dos casos incluídos nesta investigação encontra-se no Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos (ReBEC; UTNU1111-1238-5402).

Foram selecionados pacientes apresentando dentes com diagnóstico pulpar de pulpite irreversível sintomática (n = 12). Para tanto, foram analisadas amostras da cárie dental (n = 12) e canais radiculares (n = 12).

Incluídos neste estudo, pacientes com a) dentes com vitalidade pulpar, b) sintomatologia dolorosa intensa e prolongada aos testes de sensibilidade pulpar (teste térmico-frio), c) dor espontânea no momento do atendimento e d) sem lesão periapical aparente radiograficamente. Por outro lado, os critérios de exclusão serão: a) uso de antibiótico terapia prévia nos últimos 3 meses, b) canais expostos a cavidade oral, c) casos em que o isolamento absoluto não seja possível, d) casos com doença periodontal avançada, e) pacientes jovens com histórico de traumatismos dentais recentes, f) dentes com rizogênese incompleta, g) dentes com presença de curativos de demora na câmara pulpar e h) tratamentos endodônticos anteriores.

Inicialmente, realizou-se descontaminação da face externa do paciente com solução de clorexidina a 2%, seguida da anestesia local do dente selecionado para o estudo. Em seguida, foi

realizado polimento coronário com pedra pomes e água.. Após a profilaxia do elemento dental foi instalado o isolamento absoluto e selado a interface coroa dental/lençol de borracha com cianocrilato (Super Bonder, Loctite, São Paulo, SP) com o objetivo de prevenir infiltração salivar. O protocolo de desinfecção do campo operatório consiste em aplicar, com auxílio de swabs estéreis, água oxigenada 30% (v/v), seguida de hipoclorito de sódio 2,5% por 30 segundos cada, seguida da neutralização com solução estéril de tiosulfato de sódio 5%. A confirmação da desinfecção do campo operatório foi realizada por meio de coleta de amostra com swab estéril e plaqueamento em Fastidious Anaerobe Agar (FAA, Lab M, Bury, UK) + 5% de sangue desfibrinado de carneiro e incubados em câmara de anaerobiose por 48 horas.

Após a finalização da abertura coronária, realizada com brocas esféricas diamantadas (#1012 ou #1014) e irrigação de solução fisiológica estéril, uma lima K #15 (Maillefer/Dentsply, Ballaigues, Suíça), com movimentos de cateterismo, foi introduzida em toda a extensão do comprimento aparente do dente, determinado por meio de radiografia pré-operatória e utilizado o localizador foraminal (Novapex, Forum Technologies, Rishon le-zion, Israel) para confirmação da patência e determinação do comprimento real de trabalho (CRT) que foi estabelecido na posição zero do localizador.

As amostras da dentina infectada foram realizadas através de curetas estéreis e armazenadas em tubo contendo VMGA III. As amostras dos canais radiculares foram realizadas com 03 cones de papel absorvente estéreis, que

permaneceram em toda a extensão dos canais radiculares, por 1 minuto, e armazenados em tubo vazio e contendo VMGA III. O material proveniente das coletas foram armazenado em freezer a -80°C para análise.

Em seguida, o tratamento endodôntico foi realizado com instrumento recíprocante (Reciproc, VDW, Munich, Alemanha) de acordo com o protocolo do fabricante. O dente foi obturado e selado com uma camada de 2 mm de Coltosol (Vigodent, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) na embocadura do canal radicular. Em seguida, restaurado em resina fotopolimerizável Z 250 (3M Dental Products, St Paul, EUA).

Procedimentos laboratoriais

Reação em cadeia da polimerase

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).

As reações de PCR foram realizadas em termociclador (GeneAmp PCR system 9700, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Cada reação foi realizada com volume total de 25 µL com mistura contendo 1X PCR buffer (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 8.3), 1,5 µl de mistura de 2,5 mM dNTP, 1 mM MgCl₂, 10 pmoles de cada *primer* (*forward* e *reverse*), 1,5 U de Taq DNA polimerase, e 10 ng de DNA da amostra.

A reação seguiu o protocolo: 95°C por 2 min, seguidos de 40 ciclos de 95°C por 30 s, 60±5 °C por 30 s, e 72°C por 1 min, em seguida, 5 min a 72°C para extensão final. Os produtos do PCR foram avaliados em gel de agarose a 1,5% em TBE (Tris-borato-EDTA) e corado com solução de brometo de etídio (1µg/mL). As imagens finais foram capturadas em câmera digital (AlphaImager 3300 System, Alpha Innotech Corp., San Leandro, CA).

A sequência dos primers para detecção de *S. mutans* nas amostras é baseado em estudo prévio (Chen et al. 2007, Bourgeois et al. 2017) e encontra-se descrito abaixo:

a) *Streptococcus mutans*:

Primer 479F – TCG CGA AA AAG ATA AAC AAA CA

Primer 479R – GCC CCT TCA CAG TTG GTT AG

b) *Candida albicans*:

CaF ACT TCT GTA AGA GTG CTG GTT C
CaR TGT CGT AAT CAA ACT CGG TAG C

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Em relação à espécie bacteriana *S. mutans*, foi observado a presença em 3/10 amostras coletadas do tecido cariado. Por outro lado, não foi detectado DNA de *S. mutans* nas amostras dos canais radiculares de dentes com pulpite irreversível.

DNA de *C. albicans* foi detectado em 3 amostras da cárie dental e em 2 amostras dos canais radiculares de dentes com pulpite irreversível sintomática.

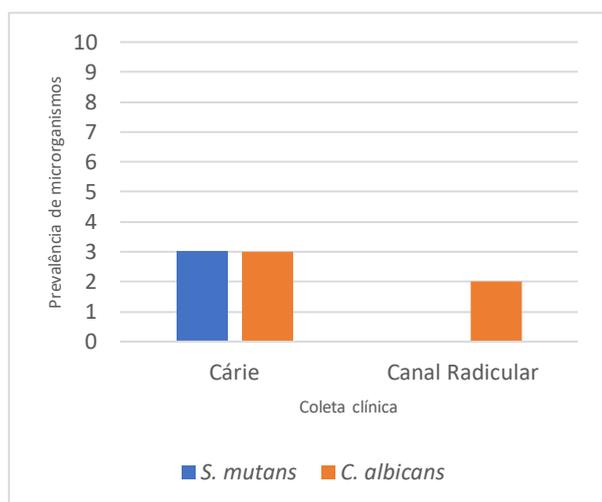


Figura 1 – Prevalência de *Streptococcus mutans* e *Candida Albicans* em amostras de cárie e canal radicular de dentes com pulpite irreversível sintomática.

A cárie dental é uma doença multifatorial, biofilme-dependente e modulada pela dieta, especialmente presença de açúcar, que tem como principal característica a dissolução da estrutura mineralizada do dente (Pitts et al. 2017). A cárie é um processo altamente dinâmico que envolve processos repetitivos de desmineralização e remineralização ao longo do dia (Featherstone 2004).

Durante muito tempo, a literatura associou a presença de *S. mutans* como a principal espécie bacteriana causadora da cárie (Rôças et al. 2016, Lima et al. 2021). No presente estudo, a baixa prevalência de *S. mutans* pode estar relacionado à grande extensão do tecido cariado (comunicação com o tecido pulpar). Sendo assim, *S. mutans* pode não ter um papel secundário nestes casos. Nossos achados estão de acordo com estudo de Rôças et al. (2015) que detectaram *S. mutans* em, aproximadamente, 30% das amostras de cáries profundas associadas à pulpite irreversível. Em relação aos canais radiculares, *S. mutans* não foi detectado em nenhuma das amostras. Fatores de seleção microbiana, tais como pH, fatores nutrocionais, interação com outras espécies

microbianas podem favorecer a não detecção desta espécie nas amostras de canais radiculares. Por outro lado, estudos envolvendo dentes com necrose pulpar evidenciou a presença de *S. mutans* nas amostras de canais radiculares (Lima et al. 2021).

C. albicans tem sido associada à cárie dental na infância e na porção radicular (Aamdal-Scheie et al., 1996; Loesche et al., 1999; de Carvalho et al., 2006). *C. albicans* foi detectada em 30% das amostras de cárie dental, corroborando com estudo prévio que observou nível similar (40%) (Arslan et al. 2016). Nos canais radiculares, a presença de *C. albicans* foi observado em 20% das amostras. Portanto, o papel deste microrganismo nas alterações pulpares em fase inicial ainda se mostra questionável.

CONCLUSÕES:

Apesar da baixa prevalência, foi detectado DNA de *S. mutans* e *C. albicans* na cárie dental de dentes com pulpite irreversível sintomática. Por outro lado, *S. mutans* não foi detectado em canais radiculares de pacientes com pulpite irreversível sintomática.

APOIO

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

BIBLIOGRAFIA

Aamdal-Scheie A, Luan WM, Dahlén G, Ferjerskov O: Plaque pH and Microflora of Dental Plaque on Sound and Carious Root Surfaces. *J Dent Res* 1996;75(11):1901-1908.

Aas JA, Griffen AL, Dardis SR, Lee AM, Olsen I, Dewhirst FE, et al. Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults. *J Clin Microbiol.* 2008 Apr;46(4):1407-17.

- Arslan S, Koç AN, Şekerci AE, Tanriverdi F, Sav H, Aydemir G, Diri H: Genotypes and virulence factors of *Candida* species isolated from oral cavities of patients with type 2 diabetes mellitus. *Turk J Med Sci* 2016;46:18-27.
- Arruda-Vasconcelos R, Louzada LM, Feres M, Tomson PL, Cooper PR, Gomes BPFA. Investigation of microbial profile, levels of endotoxin and lipoteichoic acid in teeth with symptomatic irreversible pulpitis: a clinical study. *Int Endod J.* 2021 Jan;54(1):46-60.
- Bergenholtz G. Inflammatory response of the dental pulp to bacterial irritation. *J Endod.* 1981; 7(3):100-4. PMID: 6938628.
- Bourgeois D, David A, Inquimbert C, Tramini P, Molinari N, Carrouel F. Quantification of carious pathogens in the interdental microbiota of young caries-free adults. *PLoS One.* 2017;12(10):e0185804.
- Carvalho F G, Silva D S, Hebling J, Spolidorio L C, Spolidorio D M P. Presence of mutans streptococci and *Candida* spp. in dental plaque/dentine of carious teeth and early childhood caries. *Arch Oral Biol.* 2006;51:1024-1028.
- Chen Z, Saxena D, Caufield PW, Ge Y, Wang M, Li Y. Development of species-specific primers for detection of *Streptococcus mutans* in mixed bacterial samples. *FEMS Microbiol Lett.* 2007 Jul;272(2):154-62.
- Dewhirst FE, Chen T, Izard J, Paster BJ, Tanner AC, Yu WH, et al. The human oral microbiome. *J Bacteriol.* 2010 Oct;192(19):5002-17.
- Featherstone, J. D. The continuum of dental caries — evidence for a dynamic disease process. *J. Dent. Res.* 83, C39–C42 (2004).
- Gross EL, Beall CJ, Kutsch SR, Firestone ND, Leys EJ, Griffen AL. Beyond *Streptococcus mutans*: dental caries onset linked to multiple species by 16S rRNA community analysis. *PLoS One.* 2012;7(10):e47722.
- Jiang W, Ling Z, Lin X, Chen Y, Zhang J, Yu J, et al. Pyrosequencing analysis of oral microbiota shifting in various caries states in childhood. *Microb Ecol.* 2014 May;67(4):962-9.
- Klinke T, Guggenheim W, Klimm and Thurnheer. T. Dental Caries in Rats Associated with *Candida albicans*. *Caries Res.* 2011;45:100–106.
- Lima AR, Herrera DR, Francisco PA, Pereira AC, Lemos J, Abranches J, Gomes BPFA. Detection of *Streptococcus mutans* in symptomatic and asymptomatic infected root canals. *Clin Oral Investig.* 2021 Jun; 25(6): 3535-3542.
- Loesch WJ, Taylor GW, Dominguez LD, Grossman NS, Stoll J: Factors which are associated with dental decay in the older individual. *Gerodontology* 1999;16(1):37-46.
- Marsh PD. Dental diseases--are these examples of ecological catastrophes? *Int J Dent Hyg.* 2006 Sep;4 Suppl 1:3-10; discussion 50-2.
- Marsh PD. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv Dent Res.* 1994 Jul;8(2):263-71.
- Munson MA, Pitt-Ford T, Chong B, Weightman A, Wade WG. Molecular and cultural analysis of the microflora associated with endodontic infections. *J Dent Res.* 2002 Nov;81(11):761-6.
- Pitts NB, Zero DT, Marsh PD, Ekstrand K, Weintraub JA, Ramos-Gomez F, Tagami J, Twetman S, Tsakos G, Ismail A. Dental caries. *Nat Rev Dis Primers.* 2017 May 25;3:17030.
- Rôças IN. Advanced caries microbiota in teeth with irreversible pulpitis. *Journal of Endodontics*, v. 41, n. 9, p. 1450-55, 2015.
- Rôças IN, Alves FR, Rachid CT, Lima KC, Assunção IV, Gomes PN, Siqueira JF Jr. Microbiome of Deep Dental Caries Lesions in Teeth with Symptomatic Irreversible Pulpitis. *PLoS One.* 2016 May 2;11(5):e0154653.
- Sakamoto M, Rôças IN, Siqueira JF Jr, Benno Y. Molecular analysis of bacteria in asymptomatic and symptomatic endodontic infections. *Oral Microbiol Immunol.* 2006 Apr;21(2):112-22.
- Santos AL, Siqueira JF Jr, Rôças IN, Jesus EC, Rosado AS, Tiedje JM. Comparing the bacterial diversity of acute and chronic dental root canal infections. *PLoS One.* 2011;6(11):e28088.
- Shen S, Samaranayake LP, Yip HK. Coaggregation profiles of the microflora from root surface caries lesions. *Arch Oral Biol.* 2005;50(1):23-32.
- Schulze-Schweiffing K, Banerjee A, Wade WG. Comparison of bacterial culture and 16S rRNA community profiling by clonal analysis and pyrosequencing for the characterization of the dentine caries-associated microbiome. *Front Cell Infect Microbiol.* 2014 Nov 12;4:164.
- Sheiham A, James WP. Diet and Dental Caries: The Pivotal Role of Free Sugars Reemphasized. *J Dent Res.* 2015 Oct;94(10):1341-7.
- Siqueira JF Jr, Rôças IN. Diversity of endodontic microbiota revisited. *J Dent Res.* 2009 Nov;88(11):969-81.
- Ugun-Can B, Kadir T, Akyuz S: Oral candidal carriage in children with and without dental caries. *Quintessence Int.* 2007;8:45-49.
- Zaremba ML, Stokowska W, Klimiuk A, Daniluk T, Rozkiewicz D, Cylwik-Rokicka D, Waszkiel D, Tokajuk G, Kierklo A, Abdelrazek S. Microorganisms in root carious lesions in adults. *Adv Med Sci.* 2006;51Suppl1:237-240.