



Identificação molecular de espécies fúngicas em dentes indicados a reintervenção endodôntica pelo insucesso do tratamento endodôntico primário, ou por motivos exclusivamente protéticos

Palavras chave: Endodontia, Nester PCR, Candida

Autores: Guilherme Augusto Albuquerque de Sousa, Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes, Ederaldo Pietrafesa de Godoi Jr, Pedro Ivo da Graça Fagundes.

INTRODUÇÃO

O principal objetivo do tratamento endodôntico é prevenir ou tratar as doenças pulpares e periapicais com intuito de se promover a manutenção do dente em função na cavidade oral. Por outro lado, a persistência de microrganismos no conduto radicular, assim como sua recontaminação pode acarretar o insucesso do tratamento endodôntico primário, sendo a reintervenção endodôntica como primeira opção terapêutica para o tratamento de periodontites apicais persistentes/recorrentes (Gomes et al., 2008; Endo et al., 2013; Brabosa-Ribeiro et al., 2016; 2020; Gomes et al., 2021). Podendo também ser indicada previamente a instalação de reabilitações protéticas em dentes tratados endodonticamente livres de alterações periapicais com intuito de se promover descontaminação adicional ao conduto radicular visando maior longevidade do tratamento reabilitador (Bícego-Pereira et al., 2021).

O perfil microbiológico associado as infecções secundárias/persistentes foi inicialmente traçado a partir de estudos que utilizaram métodos de microbiologia clássica, baseados no cultivo e isolamento de microrganismos, revelando alta prevalência de bactérias anaeróbias facultativas, Gram-positivas (Molander et al., 1998; Sundvist et al., 1998; Siqueira et al., 2001; Pinheiro et al., 2003). Apesar de serem detectadas em menores prevalências espécies fúngicas também foram isoladas a partir de dentes endodonticamente tratados portadores de insucesso do tratamento endodôntico prévio, destacando-se um predomínio de *Candida* spp. no microbioma associado as infecções secundárias/persistentes (Peculiene et al., 2001; Egan et al., 2002; Pinheiro et al., 2003; Mindere et al., 2010; Pourhajibagher et al., 2017).

Apesar de serem valiosos para análise do conteúdo microbiológico associado as infecções endodônticas, métodos de microbiologia clássica sofrem de limitações inerentes a dificuldade de se mimetizar o ambiente propício para o desenvolvimento simultâneo de todos os microrganismos associados a infecção. O que pode fazer com que a comunidade microbiana seja subestimada, se analisada exclusivamente através da cultura (Gomes et al., 2008; Endo et al., 2013; Gomes et al., 2021).

Métodos moleculares possuem como principal vantagem o fato de serem independentes do cultivo microbiano, sendo desta forma capazes de contornar as limitações inerentes aos métodos de microbiologia clássica (Gomes et al., 2008; Endo et al., 2013; Barbosa-Ribeiro et al., 2016; 2020; Gomes et al., 2021). A técnica de *PCR* é uma técnica altamente sensível e específica capaz de detectar a presença de material genético de microrganismos mesmo quando em baixas concentrações, o que a torna efetiva na detecção de microrganismos de difícil cultivo (Gomes et al., 2008; Endo et al., 2013; Bronzato et al., 2021). A aplicação de métodos moleculares para determinação da comunidade microbiana associada as infecções endodônticas secundárias/persistentes reafirmou a presença de *Candida* spp. nos casos de insucesso do tratamento endodôntico, revelando maiores prevalências do gênero que as previamente relatadas através de métodos de cultura (Siqueira et al., 2004; Dumani et al., 2012; Poptani et al., 2013; Pourhajibagher et al., 2017).

Uma vez descrito o envolvimento de espécies fúngicas em casos de insucesso do tratamento endodôntico primário, o presente estudo teve como principal objetivo analisar e comparar através do método molecular de *Nested-PCR* o envolvimento das espécies *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*, em 10 casos indicados a reintervenção endodôntica devido a infecção secundária/persistente evidenciada pela presença de periodontite apical crônica, e 10 casos indicados a reintervenção endodôntica por motivos exclusivamente protéticos livres de alterações periapicais, com intuito de se fornecer um maior entendimento, sobre o microbioma associado ao insucesso endodôntico, e seu papel no desenvolvimento das periodontites apicais crônicas em dentes endodonticamente tratados.

PROPOSIÇÃO

Os objetivos do estudo foram: a) Determinar a prevalência de *Candida glabrata*, *Candida krusei* e *Candida parapsilosis* em casos de insucesso do tratamento endodôntico (ITE) evidenciado por 10 casos pela presença de periodontite apical crônica (PAC) e 10 casos por motivos protéticos (MP); b) Monitorar os efeitos do preparo-químico mecânico (PQM) e do uso de medicação intracanal (MIC) sobre as espécies fúngicas; c) Correlacionar a presença de aspectos clínicos a presença de *C.glabrata*, *C.krusei* e *C.parapsilosis*.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a investigação da relação proposta, foram selecionados 20 pacientes apresentando dentes com necessidade de retratamento endodôntico, por motivos exclusivamente protéticos (n=10) ou pelo insucesso do tratamento anterior evidenciado por lesão periapical (n=10). **Serão incluídos** casos de pacientes: que apresentavam dentes tratados endodonticamente, sendo a presença de tratamento endodôntico prévio confirmado 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. E como **critérios de exclusão**: 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. A coleta das amostras advindas dos pacientes foi realizada na clínica de Pós-graduação da Instituição por aluno de pós-graduação e o processamento destas será realizado no Laboratório de Microbiologia aplicada à Endodontia.

As coletas endodônticas, foram realizadas utilizando um total de 3 cones de papel absorvente estéreis/apirogênicos de calibre FM (Dentsply, Petrópolis, RJ, Brasil) introduzidos um a um no comprimento total do canal, permanecendo por 1 minuto cada um. Esses cones serão transferidos para tubos do tipo *ependorfs* previamente esterilizados, contendo 1,0 mL do meio de transporte pré-reduzido VMGA III – Viability Medium Goteberg Agar (Moller 1966; Dahlen et al., 1993) e transportados em jarros a vácuo para o Laboratório de Microbiologia da disciplina de Endodontia da FOP-UNICAMP para posterior processamento. A seguir os *ependorfs* serão congelados em freezer -80°C para futuras análises.

Procedimentos laboratoriais

Extração do DNA

As extrações de DNA dos dentes incluídos serão 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 será realizada a 260 nm através de espectrofotometria (Nanodrop 2000; Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA).

Reação Universal de PCR (*Candida* spp.)

As amostras serão inicialmente submetidas a uma primeira reação de polimerase em cadeia visando amplificação total do gene 18S rRNA. Serão utilizados os primers Yeast universal (Haynes; Westerneng, 1996) que amplificam um fragmento de 600-640 pares de base. As condições de amplificação, bem como as etapas de ciclagem serão realizadas como o descrito por Haynes & Westerneng (1996).

Reação Espéfica de PCR

Os produtos da primeira reação de PCR serão submetidos a uma segunda reação PCR subsequente visando a amplificação de regiões do gene 18s rRNA hipervariáveis entre as espécies de *Candida*, caracterizando uma reação de *Semi-Nested*.

Para realização da segunda reação de PCR mantém-se o uso do primer Yeast Universal (R) (637-654-bp) e acrescenta-se o primer (F) específico para cada uma das espécies de *Candida* investigadas, o uso de primers sense distintos para cada variante, permitirá a diferenciação, por meio de diferentes tamanhos de fragmentos, possibilitando assim a genotipagem dos fungos em dados metagenômicos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste presente estudo foram analisadas 20 amostras de pacientes com a faixa de idade de 30 a 69 anos, com a média de idade de 48,5 anos, 15 (75%) pacientes do sexo feminino e 5 (25%) do sexo masculino. Destes 20 pacientes participantes, 10 se incluíram no grupo que eram indicados para retratamento por apresentarem periodontite apical crônica e outros 10 pacientes que necessitavam de retratamento por motivos protético, onde se encontravam sem lesão periapical. O quadro clínico dos mesmos não apresentava dor. A média dos tratamentos endodônticos anteriores realizados nestes pacientes foi de 9,8 anos.

Os dentes incluídos neste grupo de **casos indicados ao retratamento pela presença de periodontite apical crônica após tratamento endodôntico anterior** foram 10 dentes. Foram incluídos neste grupo, 6 dentes unirradiculares (60%) e 4 dentes multirradiculares (40). Dentre os casos relacionados a lesão periapical foram encontrados apenas presença de *Candida glabrata* (10/10), presentes em todas as amostras. *Candida krusei* e *Candida parapsilosis* não foram detectadas em nenhuma amostra dos CRs.

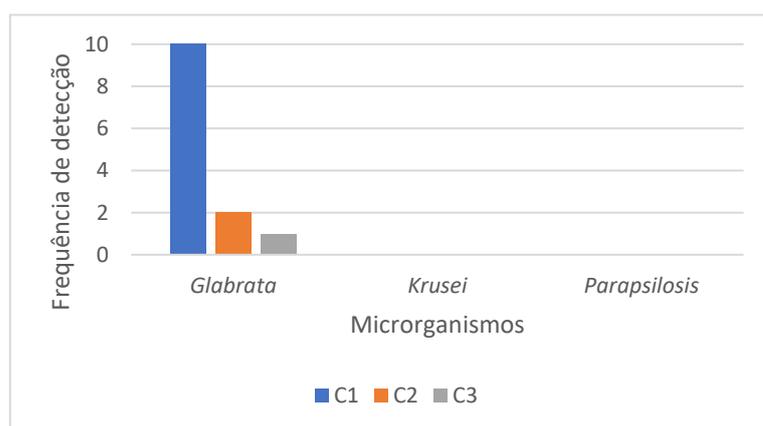


Gráfico 1- Espécies Fúngicas X Frequência de Detecção (Periodontite Apical Crônica - grupo com lesão), encontrada nos diferentes tempos de tratamento C1 (Coleta Inicial), C2 (PóS-PQM), C3 (PóS-MIC).

Os dentes incluídos neste grupo de casos indicados ao retratamento somente por motivo protético foram 10 dentes.. Foram incluídos neste grupo, 4 dentes unirradiculares (40%) e 6 dentes multirradiculares (60%). Dentre os casos relacionados aos canais radiculares sem lesão periapical foram encontrados a presença dos seguintes microrganismos *Candida krusei* (1/10). *Candida glabrata* e *Candida parapsilosis* não foram detectadas em nenhuma amostra dos CRs.

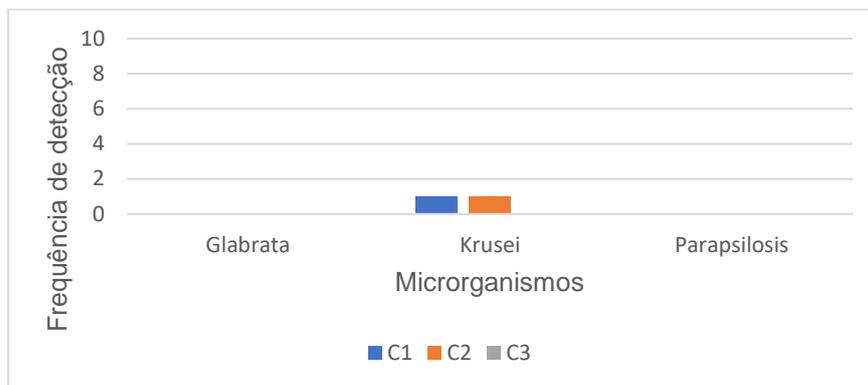


Gráfico 2- Espécies Fúngicas X Frequência de Detecção (Motivos Protético - grupo sem lesão) encontrada nos diferentes tempos de tratamento C1 (Coleta Inicial), C2 (Pós-PQM), C3 (Pós-MIC).

Na literatura existem diversos estudos que investigaram a presença de microrganismos em dentes com insucesso do tratamento endodôntico e presença de periodontite apical crônica (CL) .(Pinheiro et al., 2003; Gomes et al., 2004; 2006; 2008b; Endo et al., 2013; Barbosa-Ribeiro 2020ab; Gomes et al., 2021). Entretanto, poucos investigaram a presença de microrganismos em dentes com necessidade de retratamento endodôntico por motivos protéticos, mesmo radiograficamente não apresentando lesão periapical.

Foi utilizado o método de identificação fúngica (gene 18s), através do PCR e Nested-PCR, afim de avaliar a presença de conteúdo microbiológico dos casos com lesão periapical crônica (CL) e dos casos por motivos protéticos (SL), objetivando identificar espécies fúngicas (*C.glabrata*, *C.parapsilosis*, *C.krusei*), pautou-se na alta eficiência, especificidade e sensibilidade descrita em estudos prévios (Siqueira et al., 2004; Gomes et al., 2008b; Endo et al., 2013; Barbosa-Ribeiro et al., 2020ab).

Neste estudo, optou-se por utilizar *Candida glabrata*, *Candida krusei* e *Candida parapsilosis* com objetivo de utilizar fungos uma vez que estes microrganismos também são encontrados na infecções de origem endodôntica. Além disso a combinação destes microrganismos é baseada na literatura .(Pinheiro et al., 2003; Gomes et al., 2004; 2006; 2008b; Endo et al., 2013; Barbosa-Ribeiro 2020ab; Gomes et al., 2021).

CONCLUSÃO

Os resultados encontrados no presente estudo permitiram concluir que: A comunidade microbiana associada aos dois grupos apresenta uma microbiota diversificada de fungos; ,*Candida glabrata* foi detectada em 100% nas amostras iniciais de C1 do grupo com Lesão (CL). No Grupo por motivos protético(SL) a mais frequente foi *Candida krusei*. Os perfis microbiológicos de ambas as condições são semelhantes, variando porém no número das espécies detectadas por canal sendo maior em dentes com lesão periapical; Foram encontradas associações entre determinadas espécies fúngicas e bacterianas com a presença de lesão periapical.

(Apoio FAPESP 2015/23479-5, 2017/16516-7, 2019/14448-0, 2021/13871-6, 2021/14570-0; CNPq 303852/2019-4, 421801/2021-2; (CAPES Finance Code 001).

CEP: CAAE 483746157.0000.5418 Parecer: 4.301.708

SISGEN: AD8AABAUM

FAPEX 2036/17

REFERÊNCIAS

- Barbosa-Ribeiro M, Arruda-Vasconcelos R, Mendes Louzada L, Rodrigues Lima A, Marciano M, Affonso de Almeida JF, De-Jesus-Soares A, Zaia AA, Ferraz C, Gomes BP. Microbiological Investigation in Teeth with Persistent/Secondary Endodontic Infection in Different Stages of Root Canal Retreatment. Eur Endod J. 2020 Dec;5(3):219-225. doi: 10.14744/eej.2020.73626. PMID: 33353920; PMCID: PMC7881382.

- 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 Apr;42(4):552-6. doi: 10.1016/j.joen.2016.01.002. PMID: 27000273.
- Bicego-Pereira EC, Barbosa-Ribeiro M, de-Jesus-Soares A, Zaia AA, Ferraz CCR, Almeida JFA, Marciano MA, Feres M, Gomes BPFA. 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.* 2020 Sep;24(9):3243-3254. doi: 10.1007/s00784-020-03200-z. Epub 2020 Jan 20. PMID: 31960131.
- Bronzato JD, Davidian MES, de Castro M, de-Jesus-Soares A, Ferraz CCR, Almeida JFA, Marciano MA, Gomes BPFA. Bacteria and virulence factors in periapical lesions associated with teeth following primary and secondary root canal treatment. *Int Endod J.* 2021 May;54(5):660-671. doi: 10.1111/iej.13457. Epub 2020 Dec 28. PMID: 33270246.
- Dumani A, Yoldas O, Yilmaz S, Koksal F, Kayar B, Akcimen B, Seydaoglu G. Polymerase chain reaction of enterococcus faecalis and candida albicans in apical periodontitis from Turkish patients. *J Clin Exp Dent.* 2012 Feb 1;4(1):e34-9. doi: 10.4317/jced.50669. PMID: 24558522; PMCID: PMC3908807.
- Egan MW, Spratt DA, Ng YL, Lam JM, Moles DR, Gulabivala K. Prevalence of yeasts in saliva and root canals of teeth associated with apical periodontitis. *Int Endod J.* 2002 Apr;35(4):321-9. doi: 10.1046/j.1365-2591.2002.00478.x. PMID: 12059932.
- Endo MS, Ferraz CCR, Zaia AA, Almeida JFA, Gomes BPFA. Quantitative and qualitative analysis of microorganisms in root-filled teeth with persistent infection: Monitoring of the endodontic retreatment. *Eur J Dent.* 2013 Jul;7(3):302-309. doi: 10.4103/1305-7456.115414. PMID: 24926210; PMCID: PMC4053619.
- Gomes BP, Pinheiro ET, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ. Microbial analysis of canals of root-filled teeth with periapical lesions using polymerase chain reaction. *J Endod.* 2008 May;34(5):537-40. doi: 10.1016/j.joen.2008.01.016. Epub 2008 Mar 4. PMID: 18436030.
- Gomes BPFA, Francisco PA, Godoi EP Jr, Endo MS, Barbosa-Ribeiro M, Delboni MG, Pecorari VGA. Identification of Culturable and Nonculturable Microorganisms, Lipopolysaccharides, and Lipoteichoic Acids From Root Canals of Teeth With Endodontic Failure. *J Endod.* 2021 Jul;47(7):1075-1086. doi: 10.1016/j.joen.2021.04.011. Epub 2021 Apr 19. PMID: 33887307.
- Gutmann JL, Baumgartner JC, Gluskin AH, Hartwell GR, Walton RE. Identify and define all diagnostic terms for periapical/periradicular health and disease states. *J Endod.* 2009 Dec;35(12):1658-74. doi: 10.1016/j.joen.2009.09.028. PMID: 19932340.
- 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.* 1996 May;44(5):390-6. doi: 10.1099/00222615-44-5-390. PMID: 8636954.
- Mindere A, Kundzina R, Nikolajeva V, Eze D, Petrina Z. Microflora of root filled teeth with apical periodontitis in Latvian patients. *Stomatologija.* 2010;12(4):116-21. PMID: 21266836.
- Molander A, Reit C, Dahlén G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* 1998;31:1–7. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2591.1998.t01-1-00111.x>.
- Peciuliene V, Reynaud AH, Balciuniene I, Haapasalo M. Isolation of yeasts and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis. *Int Endod J.* 2001 Sep;34(6):429-34. doi: 10.1046/j.1365-2591.2001.00411.x. PMID: 11556508.
- Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Sousa EL, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J.* 2003 Jan;36(1):1-11. doi: 10.1046/j.1365-2591.2003.00603.x. PMID: 12656508.
- Poptani B, Sharaff M, Archana G, Parekh V. Detection of *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans* in previously root-filled teeth in a population of Gujarat with polymerase chain reaction. *Contemp Clin Dent.* 2013 Jan;4(1):62-6. doi: 10.4103/0976-237X.111622. PMID: 23853454; PMCID: PMC3703696.
- Pourhajibagher M, Ghorbanzadeh R, Bahador A. Culture-dependent approaches to explore the prevalence of root canal pathogens from endodontic infections. *Braz Oral Res.* 2017 Dec 18;31:e108. doi: 10.1590/1807-3107bor-2017.vol31.0108. PMID: 29267669.
- 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.* 1998 Jan;85(1):86-93. doi: 10.1016/s1079-2104(98)90404-8. PMID: 9474621.
- Siqueira JF Jr. Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. *Int Endod J.* 2001 Jan;34(1):1-10. doi: 10.1046/j.1365-2591.2001.00396.x. PMID: 11307374.
- Siqueira JF Jr, Sen BH. Fungi in endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004 May;97(5):632-41. doi: 10.1016/S1079210404000046. PMID: 15153878.