



PREVALÊNCIA DE COMPLEXOS MICROBIANOS VERMELHO E LARANJA EM LESÕES ENDODÔNTICO-PERIODONTAIS COM POLPA VITAL

Palavras-Chave: Endodontia, lesões endoperiodontais, nested PCR.

Autores/as:

Lara de Carvalho Tarlá [FOP UNICAMP]

Lidiane Mendes Louzada [FOP UNICAMP]

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

INTRODUÇÃO:

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, irrigação e utilização de medicação intracanal 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).

Os microrganismos presentes nos biofilmes gengivais foram classificados em complexos relacionados em uma sucessão ecológica, sendo os complexos azuis, roxos, verdes e amarelos responsáveis pela colonização inicial das superfícies do periodonto, seguidas pelos microrganismos pertencentes ao complexo laranja e, por sua vez, pelo complexo vermelho (Socransky et al., 1998).

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 dos complexos vermelho e laranja através do Nested PCR de pacientes submetidos à terapia endodôntica com doença periodontal crônica, avaliar os efeitos da terapia endodôntica usando clorexidina gel 2% sobre o conteúdo infeccioso periodontal e endodôntico em dentes que não respondem à longos períodos da terapia periodontal e avaliar a influência do conteúdo infeccioso e a correlação do perfil microbiológico específico do complexo vermelho e laranja presente nas bolsas periodontais e nos canais radiculares com as características clínicas.

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).

Crítérios de inclusão e exclusão, aspectos clínicos e radiográficos

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

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. 2015, Martinho & Gomes 2007, Duque 2019).

Procedimentos Laboratoriais

Identificação microbiana pelo método molecular 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.

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 min).

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 (5µg/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: *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens* e *Parvimonas micra*.

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%.

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 E DISCUSSÃO:

As espécies mais prevalentes nas bolsas periodontais (BP) foram *E. faecalis*, *T. forsythia*, *P. gingivalis*, *P. micra*, *T. denticola* e *A. naeslundii*. Considerando o complexo laranja, nos canais radiculares (CR) houve prevalência de *P. micra*. *P. gingivalis* e *T. Forsythia* pertencentes ao complexo vermelho prevalecem apenas em bolsas periodontais. Sendo assim, os achados revelaram que os microrganismos do complexo vermelho não foram encontrados muito

frequentemente no canal radicular. Porém, a similaridade microbiana presente nos dois sítios reforça a teoria de que um pode exercer influência sobre a contaminação do outro (Gomes et al., 2015, Gambin et al., 2021).

O presente estudo encontrou uma alta frequência de *P. micra* em doença periodontal crônica primária com envolvimento endodôntico secundário e com presença de vitalidade pulpar, que pertence ao complexo laranja. O processo de colonização desses microrganismos em tecido periodontal está bem estabelecido. No entanto, o processo de colonização do tecido pulpar por esses microrganismos não é totalmente elucidado na literatura científica (Li et al., 2014, Louzada et al., 2020). Os túbulos dentinários têm um diâmetro entre 1,7 a 4 µm (Carda & Peydró, 2006) e o forame apical de 240 µm (Abarca et al., 2014). O tamanho dos microrganismos também mostra diâmetros variados, sendo *P. micra* 0,3-0,7 µm. Tais condições permitem que esses microrganismos tenham passagem entre os sítios periodontais e endodônticos (Gambin et al., 2021; Louzada et al., 2020).

O complexo vermelho (*P. gingivalis*, *T. forsythia* e *T. denticola*) está associado à gravidade de doenças periodontais, principalmente periodontite, essa relação de sinergismo desses microrganismos foram observados nas amostras iniciais deste estudo. Porém, o tratamento endodôntico completo com PQM e 30 dias de MIC favoreceu a redução microbiana do complexo vermelho e laranja tanto nas BP quanto nos CR. Somente a terapia química e mecânica endodôntica não pode eliminar completamente todas as bactérias envolvidas nesse tipo de lesão. No entanto, a diminuição da quantidade bacteriana e o controle de fatores modificadores através da terapia endodôntica e manutenção da terapia periodontal após 3 meses da finalização do primeiro tratamento podem paralisar a atividade da doença (Gambin et al., 2021; Duque et al., 2019; Mombelli, 2018).

CONCLUSÕES:

Pode-se concluir que lesões endodônticas-periodontais são colonizadas por microrganismos patogênicos e semelhantes entre as BP e CR, com prevalência de *P. micra* do complexo laranja nos CRs e *P. gingivalis* e *T. Forsythia* do complexo vermelho nas BPs. A prevalência de microrganismos específicos nesse tipo de lesão é importante para entender o perfil microbiológico dos pacientes envolvidos e para correlacioná-lo com possíveis condições clínicas e de reparo desta patologia.

APOIO:

FAPESP 2021/14459-1, 2019/19300-0, 2015/23479-5, CNPq 303852/2019-4, CAPES 001).
Pibic/SAE

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abarca J, Zaror C, Monardes H, Hermosilla V, Muñoz C, Cantin M (2014) Morphology of the physiological apical foramen in maxillary and mandibular first molars. *Int J Morphol* 32(2):671–677.
2. Al-Fouzan Khalid. A New Classification of Endodontic-Periodontal Lesions. *Int J Dent*. 2014; 2014: 919173

3. 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
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. Carda C, Peydró A (2006) Ultrastructural patterns of human dentinal tubules, odontoblasts processes and nerve fibres. *Tissue Cell* 38(2):141–150.
6. 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.
7. Gambin DJ, Vitali FC, De Carli JP, Mazzon RR, Gomes BPFA, Duque TM, Trentin MS. Prevalence of red and orange microbial complexes in endodontic-periodontal lesions: a systematic review and meta-analysis. *Clin Oral Investig.* 2021 Dec;25(12):6533-6546.
8. 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.
9. 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
10. Gomes BP, Endo MS, Martinho FC. Comparison of endotoxin levels found in primary and secondary endodontic infections. *J Endod.* 2012; 38:1082-1086.
11. Gomes BP, Jacinto RC, Pinheiro ET, Sousa EL, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ. Molecular analysis of *Filifactor alocis*, *Tannerella forsythia*, and *treponema denticola* associated with primary endodontic infections and failed endodontic treatment. *J Endod.* 2006; 32:937-40b.
12. Gomes BP, Montagner F, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ. Polymerase chain reaction of *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia* in primary endodontic infections. *J Endod.* 2007; 33:1049-52.
13. Li H, Guan R, Sun J, Hou B (2014) Bacteria community study of combined periodontal-endodontic lesions using denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing analysis. *J Periodontol* 85(10):1442–1449.
14. Louzada LM, Arruda-Vasconcelos R, Duque TM, Casarin RCV, Feres M, Gomes BPFA. Clinical Investigation of Microbial Profile and Levels of Endotoxins and Lipoteichoic Acid at Different Phases of the Endodontic Treatment in Teeth with Vital Pulp and Associated Periodontal Disease. *J Endod.* 2020 Jun;46(6):736-747.
15. Marinho AC, Martinho FC, Leite FR, Nascimento GG, Gomes BP. Proinflammatory activity of primarily infected endodontic content against macrophages after different phases of the root canal therapy. *J Endod.* 2015; 41: 817-823.
16. Mombelli A (2000) (2018) Microbial colonization of the periodontal pocket and its significance for periodontal therapy. *Periodontol* 76(1):85–96.
17. Simring M, Goldberg. The Pulpal Pocket Approach: Retrograde Periodontitis. *J. Periodontol.* 1964; 35: 1-22.
18. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr (1998) Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 25:134–144.
19. Solomon C, Chalfin H, Kellert M, Weseley P. The endodontic-periodontal lesion: a rational approach to treatment. *J Am Dent Assoc.* 1995; 126: 473-479.
20. Stashenko P, Jandinski JJ, Fujiyoshi P, Rynar J, Socransky SS. Tissue levels of bone resorptive cytokines in periodontal disease. *J Periodontol.* 1991; 62: 504-509.
21. Vianna ME, Horz HP, Conrads G, Zaia AA, Souza-Filho FJ, Gomes BP. Effect of root canal procedures on endotoxins and endodontic pathogens. *Oral Microbiol Immunol.* 2007; 22: 411-418.