



Associação de bactérias Gram-Positivas e insucesso endodôntico: Análise em dentes criopulverizados

Palavras-Chave: ENDODONTIA-1, MICROBIOLOGIA-2, INFECÇÃO PERSISTENTE-3

LEONARDO CASSIM RUFINO, FOP – UNICAMP

LARISSA DE SOUZA OLIVEIRA, FOP – UNICAMP

GABRIEL FERNANDES PATRONIERI, FOP – UNICAMP

MARIANA NERY DOS SANTOS MACHADO, FOP – UNICAMP

ERICA MENDES LOPES, FOP – UNICAMP

EDERALDO PIETRAFESA DE GODOI-JR, FOP – UNICAMP

MARINA ANGELICA MARCIANO, FOP – UNICAMP

Prof.^a Dr.^a. BRENDA PAULA FIGUEIREDO DE ALMEIDA GOMES (ORIENTADORA), FOP – UNICAMP

INTRODUÇÃO:

As bactérias Gram-positivas são encontradas em infecções do canal radicular e estão ligadas a sintomatologias como dor e edema (Gomes & Herrera, 2018). Seus fatores de virulência incluem a capacidade de adesão, formação de biofilme e produção de enzimas (Pinto et al., 2023). A resistência microbiana e a formação de biofilmes são as principais causas do insucesso em tratamentos endodônticos, pois permitem que as bactérias persistam nos canais radiculares (Ricucci, Loghin, & Siqueira, 2013; Signoretti et al., 2013; Barbosa-Ribeiro et al., 2021).

O terço apical é uma área crítica devido à sua anatomia complexa e proximidade com tecidos periapicais, o que favorece a seleção de bactérias resistentes (Arnold, Ricucci, & Siqueira, 2013; Siqueira Jr. et al., 2004). Essa anatomia caracterizada por ramificações, favorece a persistência da infecção. As bactérias na região apical obtêm nutrientes de fluidos teciduais, explicando a predominância de gêneros como *Enterococcus*, *Parvimonas* e *Gemella* nessa área (Gomes et al., 2008; Saad et al., 2023).

Meios de cultura e métodos moleculares são usados para detectar espécies bacterianas em infecções de canais radiculares. A cultura bacteriana identifica as espécies predominantes e tem desempenhado um papel fundamental na associação de bactérias específicas com sinais e sintomas de infecções endodônticas (Molander, Reit, & Dahlen, 1998; Signoretti et al., 2013). No entanto, o cultivo é caro, demorado e trabalhoso. Por outro lado, técnicas moleculares como a reação em cadeia da polimerase (PCR) podem detectar bactérias não cultiváveis e têm sido amplamente usadas para identificar bactérias em dentes com insucesso da terapia endodôntica (Baumgartner et al., 2004; Gomes et al., 2008). Estudos de identificação baseados em PCR relataram uma maior incidência de bactérias Gram-positivas em infecções endodônticas quando comparados a estudos que utilizam apenas a cultura (Siqueira Jr. et al., 2001; Baumgartner et al., 2004).

A moagem criogênica é uma técnica que congela amostras para fragmentá-las completamente (Júnior, Tomazelli, & Krug, 2003). Na Endodontia, ela é vantajosa pois permite analisar toda a extensão do canal radicular, incluindo regiões de istmos, canais laterais, túbulos dentinários e irregularidades, possibilitando uma análise mais precisa da microbiota (Alves et al., 2009). Estudos demonstraram que essas áreas anatômicas complexas são responsáveis por abrigar as bactérias persistentes associadas ao insucesso do tratamento endodôntico (Arnold, Ricucci, & Siqueira, 2013; Oliveira et al., 2017; Zaura-Arite, van Marle, & ten Cate, 2001).

Portanto, a moagem criogênica permite uma amostragem mais completa, alcançando comunidades de biofilme profundamente enraizadas nessas irregularidades radiculares (Alves et al., 2009; Hernández et al., 2023).

OBJETIVO:

O objetivo do estudo foi avaliar a presença de bactérias Gram-positivas como *Parvimonas micra*, *Gemella morbillorum* e *Enterococcus faecalis* no terço apical de dentes com insucesso do tratamento endodôntico através da moagem criogênica e análise molecular por nested-PCR.

METODOLOGIA:

Foram coletados 10 dentes extraídos que apresentavam evidências clínicas e radiográficas de insucesso do tratamento endodôntico. As coletas ocorreram na clínica de graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba- FOP/UNICAMP. Os critérios de inclusão adotados foram: pacientes maiores de 18 anos com indicação clínica e radiográfica para a exodontia do elemento dental; raízes dos dentes completamente formadas; pacientes com ausência de doenças sistêmicas. Os critérios de exclusão foram pacientes que apresentavam idade inferior a 18 anos, dentes com rizogênese incompleta, bem como pacientes com doenças sistêmicas.

Após a extração, cada dente foi lavado abundantemente com solução salina estéril e um bisturi estéril nº 15 foi usado para remover todos os tecidos moles aderidos, incluindo lesão periapical. As superfícies externas da raiz foram limpas com esfregaços de roletes de algodão estéreis com 3% de peróxido de hidrogênio por 1min, hipoclorito de sódio a 2,5% por 1min e por fim tiosulfato de sódio a 5% estéril por 1min. Após a desinfecção, as superfícies externas das raízes foram amostradas usando uma ponta de papel estéril nº 80 umedecida com tampão TE (10 mmol/L Tris HCl, 1mmol/L EDTA e pH 7,6). Esta amostra serviu como o controle de esterilidade e foi avaliada por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) usando o gene universal 16S rRNA e primers bacterianos específicos. Com o grupo controle positivo foi utilizado DNA extraído de uma amostra de saliva humana. Os dentes foram seccionados perpendicularmente ao seu longo eixo a 6 mm do ápice para gerar um fragmento representativo do terço apical da raiz, em casos de dentes multirradiculares, foi escolhida a raiz de maior diâmetro ou a raiz que possuía a presença de lesão periapical, caso existisse. As secções foram realizadas com uma lâmina estéril de carborundum em condições de assepsia, dentro de um fluxo laminar. Após os cortes, os espécimes foram transferidos para tubos Falcon de 15 ml, que haviam sido previamente esterilizados por irradiação gama e imediatamente armazenados a -20°C. A amostra foi utilizada para a análise criogênica, na qual utilizou-se um moinho de congelamento 6750 (Spex, Metuchen, NJ, USA) operando na temperatura do nitrogênio líquido que teve como utilidade moer criogenicamente cada fragmento de dente. Os fragmentos de raiz foram transferidos para frascos individuais cilíndricos de moagem de policarbonato. Os espécimes congelados foram triturados magneticamente por uma barra de impacto de aço oscilante, que oscila para frente e para trás contra dois tampões estacionários de aço inoxidável fechando o frasco (volume = 25ml). Durante a operação o frasco foi imerso em nitrogênio líquido.

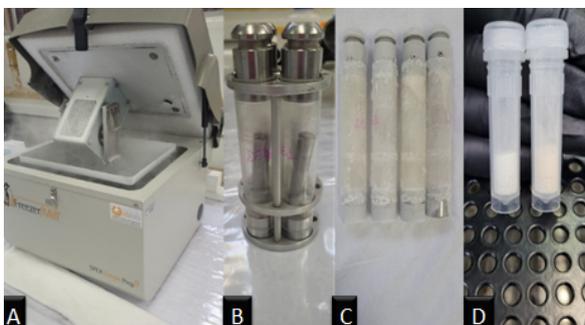


Figura 1 - Moagem criogênica. A - Moinho de congelamento 6750 (Spex, Metuchen, NJ)*, B - Frascos individuais cilíndricos de moagem de policarbonato, C - Dentes congelados nos cilindros de policarbonato, D - Criotubos contendo a amostra após a criopulverização.

Após a moagem criogênica foi realizada a extração do DNA utilizando o kit DNeasyPowerSoil Pro (Qiagen, Valencia, CA, USA) seguindo os protocolos recomendados pelo fabricante. As amostras de DNA foram quantificadas usando um espectrofotômetro Nanodrop em 260nm (Nanodrop 2000; Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). Para as reações de nested-PCR, inicialmente foi amplificada a região que abrange o gene 16S e 23S rRNA através dos Primers Universais. Produtos da reação da PCR foram analisados pelo gel de

eletroforese em agarose 1% (Invitrogen® - Life Technology do Brasil, São Paulo, SP, Brasil) em tampão de Tris-borato EDTA (pH 8,0) (TBE) corado com Novel Juice, DNA stain (1ML-Sigma-Aldrich, Co, 3050, Spruce Sweet, St Louis, Missouri, EUA). Uma escada padrão de peso molecular de 1Kb (Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil) foi incluída em cada gel e, após cada corrida (60 volts por 40 minutos), as bandas foram observadas com transiluminação de luz ultravioleta Dual LED Blue/White Light Transilluminator (Kasvi®, São José dos Pinhais, PR, Brasil). A identificação positiva ou negativa foi baseada na presença de bandas limpas de aproximadamente 1500 pares de base. Verificando 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 para análise das bactérias a serem investigadas juntamente com o L189R. As etapas finais do ciclo de PCR compreenderam 27 ciclos de desnaturação (94°C, 1 min), anelamento (52°C, 2min) e extensão (72°C, 3 min).

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

A partir de uma análise descritiva da leitura do gel de eletroforese em agarose 1%, quantificado por meio da fluorescência presente nas bandas formadas das amostras criopulverizadas, foi possível obter os seguintes resultados:

***Parvimonas micra (P. micra)*:** A presença de *Parvimonas micra* foi constatada em 5/10 amostras coletadas, representando 50% da detecção desta espécie (Fig.1)

***Gemella morbillorum (G. morbillorum)*:** A presença de *Gemella morbillorum* foi constatada em 5/10 amostras coletadas, representando 50% da detecção desta espécie (Fig.1)

***Enterococcus faecalis (E. faecalis)*:** A presença de *Enterococcus faecalis* foi constatada em 6/10 amostras coletadas representando 60% da detecção desta espécie (Fig.1)

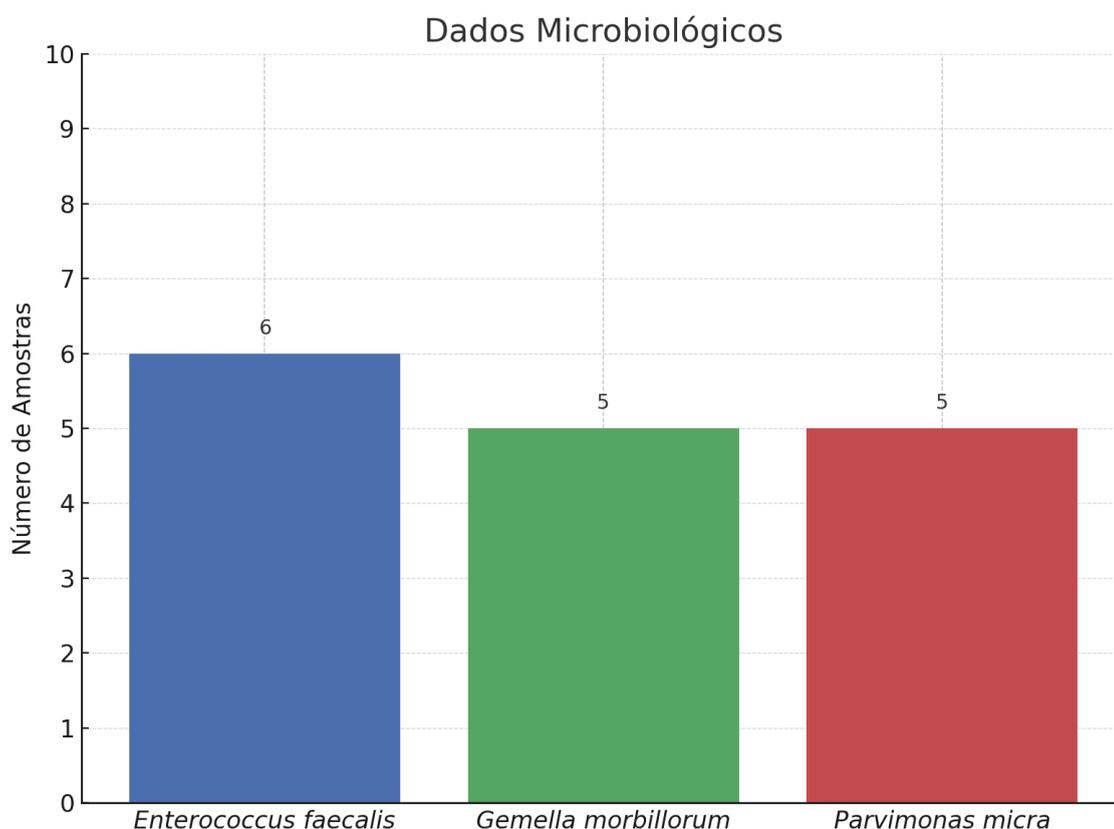


Figura 1 - Presença de *Enterococcus faecalis*, *Gemella morbillorum* e *Parvimonas micra* nas amostras coletadas

Correlações clínicas

A presença de bactérias Gram-positivas esteve associada a uma maior frequência de dor à percussão e a uma qualidade de obturação insatisfatória em dentes com infecções persistentes (Gomes & Herrera, 2018). Em estudos de casos de retratamento, *Gemella morbillorum* foi encontrada em dentes que apresentavam

sintomatologia dolorosa e falhas no tratamento anterior (Gomes et al., 2008). De forma semelhante, a presença de *Parvimonas micra* e *Enterococcus faecalis* também tem sido consistentemente relatada em dentes com lesões periapicais e sintomatologia associada ao insucesso endodôntico (Signoretti et al., 2013; Pinto et al., 2023).

As infecções endodônticas apresentam uma microbiota diversificada, mas certos grupos bacterianos estão mais frequentemente associados a quadros de insucesso (Siqueira Jr. & Rôças, 2013). As bactérias Gram-positivas, com destaque para o gênero *Enterococcus*, têm sido amplamente relacionadas a infecções secundárias e persistentes, possivelmente devido à sua elevada capacidade de sobrevivência no ambiente do canal radicular (Barbosa-Ribeiro et al., 2021; Pinto et al., 2023). Essa resiliência está associada à sua habilidade de formar biofilmes, invadir túbulos dentinários e resistir a agentes antimicrobianos (Ricucci, Loghin, & Siqueira, 2013; Oliveira et al., 2017).

O estudo de bactérias Gram-positivas é essencial, uma vez que *Enterococcus faecalis* demonstra notável capacidade de sobreviver em condições adversas, como o alto pH de medicamentos intracanaís, e expressa fatores de virulência como substância de agregação e enzimas que auxiliam na adesão e na degradação tecidual (Pinto et al., 2023). De maneira semelhante, a *Parvimonas micra*, embora um anaeróbio estrito, contribui para a patogenicidade através de sua atividade proteolítica e sua capacidade de atuar em sinergia com outras bactérias, exacerbando a resposta inflamatória (Siqueira Jr. & Rôças, 2013). A alta prevalência dessas espécies em infecções endodônticas persistentes reforça seu papel na manutenção das lesões periradiculares (Barbosa-Ribeiro et al., 2021).

O gênero *Parvimonas* está frequentemente associado a quadros sintomáticos (Gomes & Herrera, 2018). A espécie *Parvimonas micra*, em particular, é conhecida por sua capacidade de co-agregação, formando complexos microbianos que aumentam a estabilidade do biofilme (Siqueira Jr. & Rôças, 2013). Adicionalmente, *Gemella morbillorum*, embora parte da microbiota comensal, atua como um patógeno oportunista em infecções endodônticas (Gomes et al., 2008; Saad et al., 2023). Como uma bactéria anaeróbia facultativa, ela se adapta bem às condições do canal radicular tratado, e sua patogenicidade está ligada à formação de biofilmes multiespécies (Saad et al., 2023). A interação sinérgica entre *E. faecalis*, *P. micra* e *G. morbillorum* é um fator crucial para a persistência da infecção, criando uma comunidade microbiana resiliente e difícil de erradicar (Pinto et al., 2023; Siqueira Jr. & Rôças, 2013).

Apesar da diferença de prevalência entre as espécies, o uso de uma técnica de amostragem abrangente como a moagem criogênica (Alves et al., 2009) reforça a validade dos achados. A ordem quantitativa da prevalência das espécies Gram-positivas se mostrou consistente com a literatura científica (Pinto et al., 2023). A sequência observada, com *E. faecalis* sendo uma das espécies mais prevalentes em casos de insucesso do tratamento endodôntico, seguida por *P. micra* e *G. morbillorum*, corresponde ao que é frequentemente relatado em estudos sobre a microbiota de infecções persistentes (Barbosa-Ribeiro et al., 2021; Signoretti et al., 2013).

CONCLUSÕES:

As bactérias *Enterococcus faecalis*, *Gemella morbillorum*, *Parvimonas micra* podem ser encontradas no terço apical de dentes com insucesso do tratamento endodôntico. A obturação insatisfatória está associada a uma maior presença de microrganismos no terço apical e a ocorrência de dor à percussão, evidenciando o impacto negativo de falhas na desinfecção e vedação apical efetiva o que contribui para a persistência de infecção.

BIBLIOGRAFIA

Alves FR, Siqueira JF Jr, Carmo FL, Santos AL, Peixoto RS, Rôças IN, Rosado AS. Bacterial community profiling of cryogenically ground samples from the apical and coronal root segments of teeth with apical periodontitis. *J Endod.* 2009 Apr;35(4):486-92. doi: 10.1016/j.joen.2008.12.022.

Arnold M, Ricucci D, Siqueira JF Jr. Infection in a complex network of apical ramifications as the cause of persistent apical periodontitis: a case report. *J Endod.* 2013 Sep;39(9):1179-84. doi: 10.1016/j.joen.2013.04.036.

- Barbosa-Ribeiro M, Arruda-Vasconcelos R, Louzada LM, Dos Santos DG, Andreote FD, Gomes BPFA. Microbiological analysis of endodontically treated teeth with apical periodontitis before and after endodontic retreatment. *Clin Oral Investig*. 2021 Apr;25(4):2017-2027. doi: 10.1007/s00784-020-03510-2.
- Baumgartner JC, Siqueira JF Jr, Xia T, Rôças IN. Geographical differences in bacteria detected in endodontic infections using polymerase chain reaction. *J Endod*. 2004 Mar;30(3):141-4. doi: 10.1097/00004770-200403000-00004.
- Gomes BP, Montagner F, Jacinto RC, Pinheiro ET, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ. *Gemella morbillorum* in primary and secondary/persistent endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2008 Apr;105(4):519-25. doi: 10.1016/j.tripleo.2007.10.005.
- Gomes BPFA, Herrera DR. Etiologic role of root canal infection in apical periodontitis and its relationship with clinical symptomatology. *Braz Oral Res*. 2018 Oct 18;32(suppl 1):e69. doi: 10.1590/1807-3107bor-2018.vol32.0069.
- Hernández SR, Siqueira JF Jr, Voigt DD, Soimu G, Brasil SC, Provenzano JC, Mdala I, Alves FRF, Rôças IN. Bacteriological conditions of the apical root canal system of teeth with and without post-treatment apical periodontitis. A correlative multi-analytical approach. *J Endod*. 2023 Nov 15:S0099-2399(23)00723-9. doi: 10.1016/j.joen.2023.11.005.
- Júnior DS, Tomazelli AC, Krug FJ. Moagem criogênica para o preparo de amostras em técnicas analíticas. *Revista Analytica*. 2003 Fev; No 03.
- Molander A, Reit C, Dahlen G. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J*. 1998;31:1-7.
- Oliveira KV, Silva BMD, Leonardi DP, Crozeta BM, Sousa-Neto MD, Baratto-Filho F, Gabardo MCL. Effectiveness of different final irrigation techniques and placement of endodontic sealer into dentinal tubules. *Braz Oral Res*. 2017 Dec 18;31:e114. doi: 10.1590/1807-3107BOR-2017.vol31.0114.
- Pinto KP, Barbosa AFA, Silva EJNL, Santos APP, Sassone LM. What Is the Microbial Profile in Persistent Endodontic Infections? A Scoping Review. *J Endod*. 2023 Jul;49(7):786-798.e7. doi: 10.1016/j.joen.2023.05.010.
- Ricucci D, Loghin S, Siqueira JF Jr. Exuberant Biofilm infection in a lateral canal as the cause of short-term endodontic treatment failure: report of a case. *J Endod*. 2013 May;39(5):712-8. doi: 10.1016/j.joen.2012.12.008.
- Saad E, Faris ME, Abdalla MS, Prasai P, Ali E, Stake J. A Rare Pathogen of Bones and Joints: A Systematic Review of Osteoarticular Infections Caused by *Gemella morbillorum*. *J Clin Med Res*. 2023 Apr;15(4):187-199. doi: 10.14740/jocmr4891.
- Signoretti FG, Gomes BP, Montagner F, Jacinto RC. Investigation of cultivable bacteria isolated from longstanding retreatment-resistant lesions of teeth with apical periodontitis. *J Endod*. 2013 Oct;39(10):1240-4. doi: 10.1016/j.joen.2013.06.018.
- Siqueira JF Jr, Rôças IN, Souto R, Uzeda M, Colombo AP. Microbiological evaluation of acute periradicular abscesses by DNA-DNA hybridization. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2001 Oct;92(4):451-7. doi: 10.1067/moe.2001.118620.
- Siqueira JF Jr, Rôças IN, Alves FR, Santos KR. Selected endodontic pathogens in the apical third of infected root canals: a molecular investigation. *J Endod*. 2004 Sep;30(9):638-43. doi: 10.1097/01.don.0000125875.88377.85.
- Zaura-Arite E, van Marle J, ten Cate JM. Confocal microscopy study of undisturbed and chlorhexidine-treated dental biofilm. *J Dent Res*. 2001 May;80(5):1436-40. doi: 10.1177/00220345010800051001.