

## ESTUDO DA PRESENÇA DE ESPÉCIES ESPECÍFICAS ANAERÓBIAS NA CÂMARA PULPAR E CANAIS RADICULARES DE DENTES DECÍDUOS NECROSADOS

**COSTA, Luciana U.<sup>1</sup>; C.; GOMES, Genara B.<sup>2</sup>; BONOW, Maria Laura M.<sup>2</sup>; ONOFRE, Rafael S.<sup>1</sup>; JACINTO, Rogério C.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), Faculdade de Odontologia; <sup>2</sup> Universidade Federal de Pelotas, Departamento de Odontologia Social e Preventiva; <sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas, Departamento de Semiologia e Clínica ; rogeriocastilho@hotmail.com.

### 1 INTRODUÇÃO

Nas infecções dos molares decíduos as lesões normalmente se desenvolvem na furca, que não só poderia estar relacionado com a alta incidência de canais acessórios na região de furca (9), mas também com associações específicas de bactérias que infectam esses sítios. No entanto, poucos estudos têm sido realizados utilizando métodos moleculares para identificar a presença de bactérias anaeróbias em canais radiculares e na câmara pulpar de dentes decíduos necrosados (8,1).

O objetivo deste estudo foi detectar a presença de *Filifactor alocis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Parvimonas micra*, *Porphyromonas endodontalis*, *P. gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *P. Nigrescens*, *P. tanneriae*, *Tanarella forsythia*, *Treponema denticola* e *T. socranskii* na câmara pulpar (CP) e nos canais radiculares (CR) dos dentes decíduos infectados, bem como comparar a incidência dessas espécies nos dois ambientes e associar sinais e sintomas endodônticos com espécies específicas.

### 2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

Quinze crianças entre 3 e 8 anos de idade com necrose pulpar foram selecionados na Clínica de Odontopediatria (UFPEL). As seguintes informações foram coletadas: idade, sexo, dor anterior, mobilidade dentária, trato sinusal, presença de edema nos tecidos periodontais, periapicais / inter-radiculares reabsorção óssea, canais secos ou molhados, e odor. Crianças que receberam tratamento com antibióticos nos últimos 3 meses, apresentaram doenças sistêmicas e tratamentos endodônticos anteriores foram excluídas.

#### Procedimentos clínicos

Foi realizada anti-sepsia da cavidade bucal das crianças com gluconato de clorexidina 0,12%. O dente envolvido recebeu polimento coronário com pedrapomes e foi isolado com um dique de borracha. As superfícies de dente, a pinça, o dique de borracha e o arco foram desinfetados com swabs estéreis embebidos em 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, seguido de NaOCl 2,5% por 30 segundos, e em seguida neutralizado com uma solução de tiosulfato de sódio 5% (3). O tecido cariado foi removido e desgaste compensatório foi realizado com uma broca de aço inoxidável Endo-Z (Denstsply Maillefer, Ballaigues, Suíça), em alta rotação, sob irrigação com solução salina estéril.

### Coleta das amostras

As amostras foram coletadas da câmara pulpar de cada dente da seguinte forma: uma bolinha de algodão estéril umedecido em solução fisiológica estéril foi inserida na câmara pulpar e mantida em contato com o assoalho da câmara por 60 segundos e, após, foi transferida para um tubo vazio estéril 1,5ml (Axygem, Union City, CA, EUA). Então a câmara pulpar foi desinfetada com algodão embebido em solução de hipoclorito de sódio a 2,5%, que foi inativado com tiosulfato de sódio a 5%. Depois, três pontas de papel absorvente estéreis foram seqüencialmente colocados em todo o comprimento do canal mais amplo (2) por 60 segundos e transferidas para um tubo vazio estéril 1,5ml (Axygen). As amostras foram armazenadas a - 80 ° C.

### Detecção de espécies específicas

DNA bacteriano foi extraído com PureLink - Genomic DNA MiniKit (Invitrogen - Carlsbad, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Um primer universal para bactérias FUE / EUR, direcionado para 16S-rRNA gene, foi utilizado para verificar a presença de DNA bacteriano nas amostras, e primers específicos foram usados para a investigação de determinadas espécies. PCR foram realizadas com 1,5 mL de DNA extraído adicionado à mistura de reação: 2,5 mL tampão de reação, primer encaminhar 0.75µl, primer reverso 0.75µl, dNTP 0.5µl é, 1,25 mL MgCl<sub>2</sub>, 0,125 mL de Taq polimerase, e 17,625 água milli-Q mL.

As condições de PCR foram: fase 1: 95 ° C por 2 minutos; fase 2, composto por 36 ciclos de 3 etapas: etapa 1: 94 ° C por 30 segundos; etapa 2: Annealing; etapa 3: 72 ° C por 2 minutos; fase 3: 72 ° por 10 minutos; fase 4: mantido a 4 ° C. PCR foi realizada em um termociclador (Família Mastercycler - Brasil Eppendorf). Controles positivos foram realizados com cepas-padrão e controle negativo correspondeu à mistura de reação sem DNA. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel 1% agarose corados com GelRed (Biotium, Hayward, CA, EUA) e visualizados num transiluminador com luz ultravioleta (Science Major - Saratoga, CA, EUA). A detecção positiva foi baseada na presença de bandas clara do tamanho molecular esperado usando uma escala de 50 bp DNA (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA).

A análise estatística foi feita através do teste de Fisher e os dados foram digitados em uma planilha utilizando o SPSS para Windows (SPSS Inc, Chicago, IL, EUA). O nível de significância foi de 5%.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

DNA bacteriano foi detectado em todas as amostras, como demonstrado pela presença de bandas detectáveis no gel de agarose, quando a cartilha direcionada para o gene 16S rRNA foi usada. As espécies mais frequentemente detectadas no PC foram *P. nigrescens* (12/15), *P. gingivalis* (11/15) e *F. alocis* (11/15). *P.* e *T. denticola micra* foram encontrados em 2 e *T. forsythia* foi encontrado em uma amostra de PC. As espécies *F. nucleatum*, *T. socranskii*, *P.* e *P. tanneriae endodontalis* não foram detectadas. As espécies mais frequentemente detectada em RC foram *P. gingivalis* (15/15) e *P. nigrescens* (14/15). *P. tanneriae*, *P.* e *T. denticola micra* foram encontrados em seis amostras de RC, *T. forsythia* foi encontrado em quatro amostras, *F. alocis* em 2 e *P. intermedia* em 1, das 15 amostras RC. A

espécie *F. nucleatum*, *T. socranskii* e *P. endodontalis* não foram detectados em amostras de RC.

Em geral, as espécies mais foram detectadas nos canais radiculares (média 3,6) do que na câmara pulpar (média 2,7). O maior número de espécies encontradas num mesmo dente foi 7 e todos os dentes apresentaram pelo menos uma das espécies-alvo, seja na PC ou no RC. A presença concomitante de espécies microbianas na CP e no CR ocorreu em alguns casos. No entanto, apenas a presença simultânea de *P. nigrescens* na PC e no RC foi estatisticamente associada ( $p = 0,04$ ).

A presença simultânea de *P. gingivalis*, *T. forsythia* e *T. denticola*, formando o 'Complexo Red' (6), não foi encontrada na CP de todos os dentes, mas foi encontrada no RC em 3 casos.

Os gêneros mais comumente isolados nas infecções endodônticas incluem anaeróbios pigmentados de negro (7). No presente estudo, *P. gingivalis* foi detectado em todos os canais radiculares dos dentes decíduos investigados e espécies como *P. nigrescens* e *P. tanneriae* foram também altamente detectados.

Os cocos gram-positivos mais comumente isolados de canais radiculares de dentes decíduos incluem *Peptostreptococcus spp* (10). O presente estudo constatou a presença de *P. micra* em 40% dos canais radiculares e Ruvieri et al. (4) detectaram *P. micra* em 26% dos casos. A presente pesquisa não encontrou associação entre espécies específicas e sinais e sintomas endodônticos.

PCR representa um método sensível, rápido e acessível para o estudo de bactérias endodônticas (5). Mesmo que este método não permita uma análise microbiana ampla, com base nos resultados deste estudo, é possível especular que a PC e o RC apresentam diferentes perfis microbianos, pois apenas *P. nigrescens* foi associado a ambos os ambientes. Além disso, os anaeróbios investigados tiveram maior incidência nos canais radiculares do que na câmara pulpar, possivelmente devido a fatores como a diminuição gradual da tensão de oxigênio em canais radiculares, necessidades nutricionais dos microorganismos e o processo de sucessão da flora de bactérias sacarolíticas na câmara pulpar para uma flora mais proteolítica nos canais radiculares.

Nenhuma associação estatística entre as espécies específicas e a presença de áreas radiolúcidas inter-radiculares foi encontrada no presente estudo.

#### 4 CONCLUSÃO

Os resultados sugerem uma grande heterogeneidade entre as amostras de PC e RC em dentes decíduos. Anaeróbios estritos foram frequentemente detectados em amostras de PC e RC. Espécies anaeróbias específicas não puderam ser associadas a lesões inter-radiculares radiolúcidas e sinais de infecção e outros sintomas.

#### 5 REFERÊNCIAS

1. COGULU, D.; UZEL, A.; ONCAG, O.; ERONAT, C. PCR-based identification of selected pathogens associated with endodontic infections in deciduous and permanent teeth. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, v.106, p.443-449, 2008.

2. GOMES, B.P.; JACINTO, R.C.; PINHEIRO, E.T. et al. *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* in endodontic lesions detected by culture and by PCR. *Oral Microbiol Immunol*, v.20, p.211-215, 2005.
3. MOLLER, A.J. Microbiological examination of root canals and periapical tissues of human teeth. *Methodological studies*. *Odontol Tidskr*, v.74:Suppl:1-380, 1966.
4. RUVIERE, D.B.; LEONARDO, M.R.; DA SILVA, L.A.; ITO, I.Y.; NELSON-FILHO, P. Assessment of the microbiota in root canals of human primary teeth by checkerboard DNA-DNA hybridization. *J Dent Child*, v.74, p.118-123, 2007.
5. SIQUEIRA, J.F. Jr., ROCAS, I.N. PCR methodology as a valuable tool for identification of endodontic pathogens. *J Dent*, v.31, p.333-339, 2003.
6. SOCRANSKY, S.S.; HAFFAJEE, A.D.; CUGINI, M.A.; SMITH, C.; KENT, R.L. Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*, v.25, p.134-144, 1998.
7. SUNDQVIST, G.; JOHANSSON, E.; SJOGREN, U. Prevalence of black-pigmented bacteroides species in root canal infections. *J Endod*, v.15, p.13-19, 1989.
8. TAVARES, W.L.; NEVES de BRITO, L.C.; TELES, R.P. et al. Microbiota of deciduous endodontic infections analysed by MDA and Checkerboard DNA-DNA hybridization. *Int Endod J*, v.44, p.225-235, 2011.
9. WRBAS, K.T.; KIELBASSA, A.M.; HELLWIG, E. Microscopic studies of accessory canals in primary molar furcations. *ASDC J Dent Child*, v.64, p.118-122, 1997.
10. YANG, Q.B.; FAN, L.N.; SHI, Q. Polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis, cloning, and sequence analysis of bacteria associated with acute periapical abscesses in children. *J Endod*, v.36, p.218-223, 2010.