

Detecção de *Treponema denticola* em casos de abscesso perirradicular agudo

Detection of Treponema denticola in cases of acute periradicular abscesses

Isabela das Neves RÔÇAS*

José Freitas SIQUEIRA Jr.**

Amauri FAVIERI*

Kátia Regina dos SANTOS***

RÔÇAS, I. N.; SIQUEIRA Jr., J. F.; FAVIERI, A.; SANTOS, K. R. N. Detecção de *Treponema denticola* em casos de abscesso perirradicular agudo. **Pesqui Odontol Bras**, v. 14, n. 3, p. 209-212, jul./set. 2000.

Nosso objetivo foi detectar *Treponema denticola* em casos de abscesso perirradicular agudo. O DNA extraído das amostras de pus foi examinado pelo método da "Polymerase Chain Reaction" direcionada para o gene do RNAr (fração 16S). A amplificação usando o "primer" da espécie *Treponema denticola* permitiu detectá-la em 5 dos 6 casos de abscessos examinados. Apenas uma banda de tamanho esperado foi observada para as amostras positivas para esta bactéria, o que foi confirmado pela comparação com o DNA de referência do *Treponema denticola* (controle positivo). Até o momento, este é o primeiro relato da presença desta espiroqueta, considerada um importante patógeno periodontal em infecções endodônticas. Os resultados sugerem que *Treponema denticola* também pode ser um importante patógeno endodôntico.

UNITERMOS: Abscesso periapical; Treponema; Reação em cadeia por polimerase.

INTRODUÇÃO

As lesões periradiculares são alterações patológicas que ocorrem em decorrência da necrose e da infecção pulpar. O dano aos tecidos periradiculares pode ser provocado pela ação direta ou indireta das bactérias que colonizam o sistema de canais radiculares. Fatores de virulência liberados por bactérias, como enzimas, exotoxinas e produtos metabólicos, agem diretamente nesses tecidos. Componentes da própria estrutura bacteriana, como lipopolissacarídeos, peptidoglicano e ácido lipoteicóico, podem desencadear as respostas de defesa do hospedeiro, as quais podem gerar o dano tecidual. Esta última ação caracteriza um dano tecidual indiretamente causado por bactérias¹⁰.

As infecções endodônticas são mistas e semi-específicas, sendo a maior parte da microbiota composta por bactérias anaeróbias estritas^{7,14}. Mais de 150 espécies bacterianas diferentes já foram isoladas de canais radiculares infectados, algumas estando diretamente relacionadas a determinados sinais e sintomas^{7,10,14}. Todavia, algumas

espécies bacterianas presentes na microbiota endodôntica são de difícil cultivo e identificação, o que pode dificultar ou mesmo impossibilitar sua detecção. Isto pode conduzir a uma estimativa errônea referente ao papel de determinadas espécies bacterianas envolvidas na infecção do sistema de canais radiculares. Poucos estudos encontraram espiroquetas associadas às infecções endodônticas. THILO *et al.*¹⁵ (1986) observaram-nas presentes em canais radiculares de dentes envolvidos periodontalmente através da microscopia de campo escuro e NAIR⁸ (1987) por microscopia óptica e eletrônica de transmissão. Todavia, não encontramos estudos na literatura pesquisada a diferenciação de espécie (ex.: *Treponema denticola*).

Com a finalidade de detectar espécies bacterianas fastidiosas, métodos moleculares de alta especificidade e sensibilidade têm sido utilizados, como, por exemplo, o método da Reação em Cadeia da Polimerase ("Polymerase Chain Reaction" - PCR)^{3,4}. Este método baseia-se na replicação do DNA *in vitro*, permitindo a obtenção de cópias de

* Professores Assistentes e ** Professor Titular de Endodontia da Universidade Estácio de Sá, Rio de Janeiro, RJ.

*** Professora Doutora do Instituto de Microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ.

fragmentos espécie-específicos de DNA⁹. Ele envolve um par de oligonucleotídeos (“primers”) que flanqueiam um segmento de DNA a ser amplificado, ciclos consecutivos de desnaturação do DNA pelo calor, anelamento dos “primers” a suas seqüências complementares e extensão dos “primers” anelados com a enzima DNA polimerase. Uma DNA polimerase termoestável purificada a partir da bactéria termófila *Thermus aquaticus* (*Taq*), que mantém sua atividade mesmo após incubação prolongada a 95°C, é comumente empregada. Ciclos repetidos de desnaturação, anelamento e extensão produzem numerosas cópias do segmento de DNA específico, os quais podem ser detectados por eletroforese. A sensibilidade do PCR permite detectar uma única célula bacteriana em uma amostra, o que contrasta significativamente com o método de cultura, cuja sensibilidade varia entre 10³ e 10⁴ células na amostra¹⁹.

Baseado nessas premissas, nosso objetivo foi o de relatar, pela primeira vez, a detecção da bactéria *T. denticola* em casos de abscessos perirradiculares agudos, pelo método do PCR.

MATERIAIS E MÉTODOS

Seleção de casos

Foram selecionados seis casos clínicos diagnosticados como abscessos perirradiculares agudos de origem endodôntica. Todos os casos apresentavam lesões de cárie extensa, polpa necrosada, sintomatologia dolorosa, edema submucoso e evidências radiográficas de destruição óssea perirradicular. Um dos pacientes também apresentou febre.

Após anti-sepsia da mucosa na área de tumefação com solução de clorexidina a 2%, o material purulento foi coletado por meio de aspiração utilizando-se seringas estéreis descartáveis. A amostra foi, então, transferida imediatamente para criotubos contendo 1 ml de caldo Tripticase-soy contendo 5% de dimetil-sulfóxido (TSB/DMSO) e congelada a - 20°C.

Amplificação pelo PCR

As amostras conservadas em TSB-DMSO foram aquecidas a 37°C, por 10 minutos, e agitadas em vórtex por 30 segundos. A suspensão microbiana foi lavada 3 vezes com 100 µl de água bidestilada e centrifugada por 2 minutos. Os “pellets” foram lavados novamente em 100 µl de água bidestilada, fervidos por 10 minutos e resfriados em gelo. De-

pois de centrifugação para remover detritos celulares por 10 segundos a 4°C, o sobrenadante foi coletado e usado como “template” para a amplificação pelo PCR.

O DNA de referência do *T. denticola* foi extraído usando uma modificação do método descrito por SMITH *et al.*¹² (1989) servindo como controle positivo para a reação.

As seqüências dos “primers” para a região 16S do DNAr da espécie *T. denticola* foram 5' - TAA TAC CGA ATG TGC TCA TTT ACA T - 3' e 5' TCA AAG AAG CAT TCC CTC TTC TTC TTA - 3'. O tamanho relatado do amplicon é de 316 bp¹.

Para indicar a presença de bactérias nas amostras coletadas foi utilizado um par de “primers” ubíquos: 5' GAT TAG ATA CCC TGG TAG TCC AC - 3' e 5' CCC GGG AAC GTA TTC ACC G - 3', que anelam com um fragmento universal também da região 16S do gene do RNAr bacteriano. Isto serviu para demonstrar que havia DNA de origem bacteriana nas amostras e que a reação do PCR não foi inibida. O tamanho do amplicon gerado é 602 bp. A seqüência dos dois “primers” utilizados foi descrita por SLOTS *et al.*¹¹ (1995) e ASHIMOTO¹ (1996). Os “primers” foram obtidos através da Oligos Etc. Inc. (Wilsonville, OR, EUA).

O método do PCR foi realizado de acordo com SAIKI *et al.*⁹ (1998) e ASHIMOTO *et al.*¹ (1996). Aliquotas de 5 µl do sobrenadante das amostras clínicas ou 1 µl do DNA de referência da bactéria testada (200 ng/µl) foram amplificados. A mistura para amplificação continha 5 µl da amostra clínica, 5 µl 10 X tampão PCR, 1,25 unidades da *Taq* Polimerase (Gibco BRL, Gaithersburg, Md, EUA), 0,2 mM de cada desoxirribonucleosídeo trifosfato (Gibco BRL) e 1 µM de cada “primer”. A concentração de MgCl₂ na mistura foi de 2,0 mM.

A cada mistura foi adicionado óleo mineral e a amplificação foi realizada em um termociclador de DNA (PTC-100, MJ Research, Inc., Watertown, Mass, EUA). A temperatura utilizada para a primeira etapa de desnaturação do DNA foi de 95°C por 2 minutos, seguida de 36 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos. A etapa de anelamento foi realizada a 60°C por 1 minuto e a de extensão, a 72°C por 1 minuto. A etapa final foi realizada a 72°C por 2 minutos.

Os produtos gerados pela amplificação foram analisados por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão Tris-borato/EDTA, em 4 V/cm. O gel foi corado com brometo de etídeo e

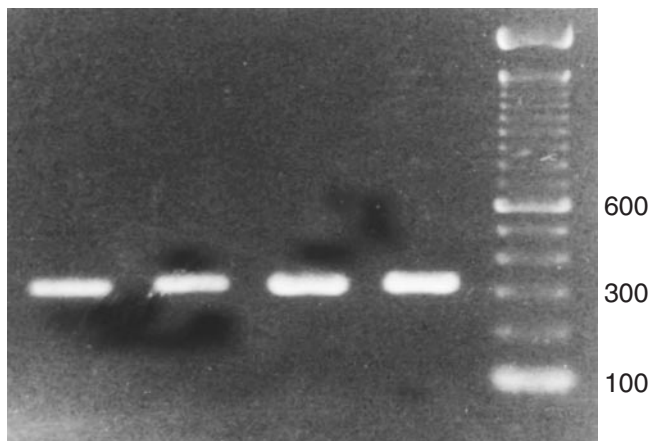


FIGURA 1 - Eletroforese das bandas geradas pela amplificação pelo PCR, utilizando-se o par de “primers” específicos para *Treponema denticola*. Na última linha à direita, padrão de DNA de 100 bp.

fotografado sob luz ultravioleta. Um padrão de DNA de 100 bp (Gibco BRL) serviu como marcador de peso molecular.

RESULTADOS

Os resultados do PCR realizado com o “primer” ubíquo confirmaram a presença de bactérias em todas as amostras analisadas. A amplificação usando o “primer” da espécie *T. denticola* permitiu detectá-la em cinco dos seis casos de abscessos examinados. Apenas uma banda, de tamanho esperado, foi observada para as amostras positivas para esta bactéria, o que foi confirmado pela comparação com o DNA de referência do *T. denticola*, que funcionou como controle positivo. A Figura 1 mostra bandas de DNA amplificado pelo PCR após a realização de eletroforese.

DISCUSSÃO

Devido à sua alta especificidade, o método do PCR apresenta um potencial significativo a ser explorado no diagnóstico microbiológico para a identificação de patógenos envolvidos no desenvolvimento e perpetuação de lesões periradiculares, por meio da amplificação de fragmentos de DNA específicos de células bacterianas. Este método permite identificar rapidamente microrganismos de cultivo difícil ou impossível, mesmo que presentes em baixo número na amostra coletada.

Inúmeros trabalhos revelaram que espiroquetas podem ser consideradas membros importantes

da microbiota infectante de canais radiculares^{2,8,15,16,17}. Entretanto, os métodos utilizados, como a microscopia de campo escuro e a eletrônica, não permitem a identificação das espécies envolvidas.

O *T. denticola* tem sido considerado um importante patógeno periodontal. Todavia, sua presença associada a infecções endodônticas ainda não havia sido relatada. Esta espécie é um espirilo anaeróbico estrito, do grupo das espiroquetas, dotado de motilidade. Pode aderir-se a fibroblastos, células epiteliais, eritrócitos, fibronectina e à hidroxiapatita coberta por saliva^{5,6,18}. Tem sido demonstrado que o *T. denticola* pode invadir células e tecidos^{5,18}, além de induzir a desgranulação de leucócitos polimorfonucleares e o aumento da produção de collagenase, gelatinase e elastase. Esta espiroqueta também apresenta atividade hemolítica, imunossupressora e algumas cepas expressam em sua superfície proteínas com atividade citotóxica e de adesão. Enzimas proteolíticas e produtos metabólicos também são prováveis fatores de virulência desta bactéria⁵.

Em nosso estudo, à partir de amostras coletadas de abscessos periradiculares agudos, foi possível identificar a espécie *T. denticola* em cinco de seis casos examinados através do método PCR. Embora as infecções endodônticas sejam consideradas multibacterianas, estes achados sugerem que esta espiroqueta pode exercer um papel importante no desenvolvimento de alterações periradiculares sintomáticas de origem endodôntica.

CONCLUSÕES

O método do PCR permitiu a detecção da bactéria *Treponema denticola* em cinco dos seis casos de abscesso examinados. Estes dados sugerem que este importante patógeno periodontal também pode estar envolvido na indução de lesões periradiculares sintomáticas de origem endodôntica. Além disso, demonstram claramente que o PCR pode ser utilizado para a rápida detecção de microrganismos envolvidos em infecções endodônticas, inclusive aqueles de cultivo difícil ou impossível.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi parcialmente financiado por verbas oriundas do CNPq e da FAPERJ.

RÔÇAS, I. N.; SIQUEIRA Jr., J. F.; FAVIERI, A.; SANTOS, K. R. N. Detection of *Treponema denticola* in cases of acute periradicular abscesses. **Pesqui Odontol Bras**, v. 14, n. 3, p. 209-212, jul./set. 2000.

The purpose of this study was to report the detection of *Treponema denticola* in five out of six cases of acute periradicular abscesses. The 16S rRNA gene directed Polymerase Chain Reaction was the method utilized. This is probably the first report hitherto of the occurrence of this spirochete in acute periradicular abscesses.

UNITERMS: Periapical abscess; Treponema; Polymerase chain reaction.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ASHIMOTO, A.; CHEN, C.; BAKKER, I.; SLOTS, J. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. **Oral Microbiol Immunol**, v. 11, p. 266-273, 1996.
2. BROWN Jr., L. R.; RUDOLPH Jr., C. E. Isolation and identification of microorganisms from unexposed canals of pulp-involved teeth. **Oral Surg**, v. 10, p. 1094-1099, 1957.
3. CONRADS, G.; GHARBIA, S. E.; GULABIVALA, K.; LAMPERT, F.; SHAH, H. N. The use of a 16S rDNA directed PCR for the detection of endodontopathogenic bacteria. **J Endod**, v. 23, p. 433-438, 1997.
4. CONRADS, G.; MUTTERS, R.; FISCHER, J.; BRAUNER, A.; LÜTTICKEN, R.; LAMPERT, F. PCR reaction and dot-blot hybridization to monitor the distribution of oral pathogens within plaque samples of periodontally healthy individuals. **J Periodontol**, v. 67, p. 994-1003, 1996.
5. FENNO, J. C.; McBRIDE, B. C. Virulence factors of oral treponemes. **Anaerobe**, v. 4, p. 1-17, 1998.
6. HAAPASALO, M.; HANNAM, P.; McBRIDE, B. C.; VITTO, V. J. Hialuronan, a possible ligand mediating *Treponema denticola* binding to periodontal tissue. **Oral Microbiol Immunol**, v. 11, p. 156-160, 1996.
7. LOPES, H. P.; SIQUEIRA Jr., J. F. **Endodontia. Biologia e técnica**. Rio de Janeiro : MEDSI, 1999.
8. NAIR, P. N. Light and electron microscopic studies of root canal flora and periapical lesions. **J Endod**, v. 13, p. 29-39, 1987.
9. SAIKI, R. K.; GELFAND, D. H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S. J.; HIGUCHI, R.; HORN, G. T.; MULLIS, K. B.; ERLICH, H. A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, v. 239, p. 487-491, 1998.
10. SIQUEIRA Jr., J. F. **Tratamento das infecções endodônticas**. Rio de Janeiro : MEDSI, 1997.
11. SLOTS, J.; ASHIMOTO, A.; FLYNN, M. J.; LI, G.; CHEN, C. Detection of putative periodontal pathogens in subgingival specimens by 16S ribosomal DNA amplification with the polymerase chain reaction. **Clin Infect Dis**, v. 20 (Suppl. 2), p. S304-307, 1995.
12. SMITH, G. L. F.; SOCRANSKY, S. S.; SMITH, C. M. Rapid method for the purification of DNA from subgingival microorganisms. **Oral Microbiol Immunol**, v. 4, p. 47-51, 1989.
13. SOCRANSKY, S. S.; HAFFAJEE, A. D.; CUGINI, M. A.; SMITH, C.; KENT, R. L. Microbial complexes in subgingival plaque. **J Clin Periodontol**, v. 25, p. 134-144, 1998.
14. SUNDQVIST, G. **Bacteriological studies of necrotic dental pulps** (Dissertation) – University of Umea. Umea, 1976.
15. THILO, B. E.; BAEHNI, P.; HOLZ, J. Darkfield observation of bacterial distribution in root canals following pulp necrosis. **J Endod**, v. 12, p. 202-205, 1986.
16. TROPE, M.; ROSENBERG, E.; TRONSTAD, L. Darkfield microscopy spirochete count in the differentiation of endodontic and periodontal abscesses. **J Endod**, v. 18, p. 82-86, 1992.
17. TROPE, M.; TRONSTAD, L.; ROSENBERG, E.; LISTGARTEN, M. Darkfield microscopy as a diagnostic aid in differentiating exudates from endodontic and periodontal abscesses. **J Endod**, v. 14, p. 35-38, 1988.
18. WHITTAKER, C. J.; KLIER, C. M.; KOLENBRANDER, P. E. Mechanisms of adhesion by oral bacteria. **Annu Rev Microbiol**, v. 50, p. 513-552, 1996.
19. ZAMBON, J. J.; HARASZTHY, V. The laboratory diagnosis of periodontal infections. **Periodontology 2000**, v. 7, p. 69-82, 1995.

Recebido para publicação em 02/08/99
Enviado para reformulação em 22/03/00
Aceito para publicação em 28/06/00