

Estudo histoquímico da presença de bactérias em lesões cariosas e periapicais

Identification of Microorganisms in Caries and Periapical Injuries: a Histochemical Study

Recebido em 20/10/2006
Aprovado em 15/12/2006

Ana Paula Veras Sobral¹
Marisa Aleixo Torres²
Antônio Henrique Santos Duarte²
Mirella Espindola de Souza²

RESUMO:

Este trabalho teve como objetivo detectar a presença de bactérias Gram positivas e/ou negativas em lesões periapicais associadas ou não à lesão cariosa através das técnicas histoquímicas de BH e BB. Foram selecionados 40 casos de lesões periapicais (20 Cistos Radiculares e 20 Granulomas Periapicais) do Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia de Pernambuco FOP/UPE e colhidos 13 dentes com cárie na clínica de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial contendo cárie. Os nossos resultados demonstraram que, para a coloração de BB, foi possível detectar a presença de bactérias em 80% dos casos de GP, 85% dos CR e 100% nos dentes cariados. Já para a coloração, de BH observaram-se microorganismos em 80% dos casos de GP, 90%, dos de CR, e 92,3%, dos de cárie. Concluímos que as técnicas histoquímicas utilizadas foram satisfatórias para detecção bacteriana, havendo uma associação entre os microorganismos da cárie e lesões periapicais, sugerindo que as periapicopatias são processos contínuos decorrentes da cárie.

Descritores: Cárie dentária; Cisto radicular, Granuloma periapical; Bactérias Gram-positivas; Bactérias Gram-negativas.

ABSTRACT

This paper set out to identify the presence of Gram-positive and Gram-negative bacteria in radicular cysts and periapical granuloma associated or not with carious injuries, using the histochemical techniques of Brown-Hoops and Brown-Benn. The Oral Pathology Department at the University of Pernambuco contributed with a total of 40 cases of periapical injuries, comprising 20 radicular cysts and 20 periapical granulomas. The Oral-Facial Surgery Department contributed with 13 carious injuries. Results demonstrated that BB technique made it possible to detect the presence of bacteria in 80% of the GP cases, in 85% of the RC cases, and in 100% of the carious injuries. Regarding the use of the BH technique, microorganisms were observed in 80% of GP cases in 90% of RC cases and in 92.3% of the carious injuries. The histochemical techniques used efficiently detected bacteria. An association between periapical microorganisms of carious and periapical injuries suggest that periapical lesions result from a continuous process arising out of decay.

Descriptors: Dental Caries; Radicular Cyst; Periapical Granuloma; Gram-Positive Bacteria; Gram-Negative Bacteria.

1. Professora Adjunta da Disciplina de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade de Pernambuco.

2. Cirurgião-Dentista pela Faculdade de Odontologia da Universidade de Pernambuco.

INTRODUÇÃO

A cárie dentária é uma doença infecciosa, crônica, transmissível, de origem bacteriana. Os microorganismos causadores da doença cárie formam colônias que aderem à superfície dentária através da placa bacteriana dental. Sob condições favoráveis, podem fermentar açúcares para produzirem ácidos, que, por sua vez, causarão a desmineralização das estruturas duras do dente (Barbosa e Medeiros, 2002; Farger, 1999). A partir de 1980, quando se demonstrou a estreita relação entre microorganismos presentes na superfície do esmalte dentário e nas cavidades abertas de cárie com a produção de ácidos, ficou evidente que a doença cárie estava na dependência da presença de microorganismos.

A mais comum porta de entrada de bactérias para a polpa é a cárie. As bactérias associadas com a cárie não são móveis, mas aparentemente avançam pelos túbulos dentinários, por divisão binária e pelo movimento do fluido dentinário. O primeiro relato sobre a presença de bactérias no canal radicular foi feito em 1967, por Antony van Leeuwenhoek. Mesmo sem dispor de grandes recursos tecnológicos, o autor já havia observado que a degradação do tecido pulpar era causada pelos organismos vivos, presentes no canal radicular (Berger, 1988).

A inflamação dos tecidos periapicais pode representar uma seqüela de necrose pulpar, advinda da cárie dental que, pela sua própria natureza, desencadearia a formação de uma lesão de evolução crônica proliferativa à qual denominamos de granuloma periapical (GP) ou cisto radicular (CR). O GP é resultado do desenvolvimento localizado de um tecido de granulação, originado de reações inflamatórias pulpares em diferentes fases de desenvolvimento (Weir et al., 1987), que, segundo Campos (1997), o CR é uma lesão que ostenta, na sua estrutura, cavidade patológica revestida por epitélio, contendo, no seu interior, material líquido ou semilíquido.

Os microorganismos estão intimamente ligados à etiologia das lesões periapicais e à sua persistência

após tratamento endodôntico. Tanto o GP quanto o CR são, geralmente, resultados da invasão bacteriana advinda da cárie (Berge, 1998).

Este trabalho tem como objetivo identificar a presença de bactérias Gram positivas e/ou negativas em lesões periapicais (GP e CR) associadas ou não à lesão cariosa através das técnicas histoquímicas de Brown-Hopps (BH) e Brown-Brenn (BB) e comparar a presença desses microorganismos nessas lesões.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram selecionados 40 casos de lesões periapicais (20 CR e 20 GP) do Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia de Pernambuco FOP/UPE. As lesões já haviam sido diagnosticadas pelo exame histopatológico, sendo registradas num período de 1991 a 2002. Todos os cortes para esse estudo já haviam sido fixados em formalina a 10%, descalcificados, emblocados em parafina e corados com HE. Treze dentes contendo lesão cariosa foram coletados na Clínica de Graduação de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial da Faculdade de Odontologia de Pernambuco/UPE mediante autorização dos pacientes, após esclarecimento sobre os objetivos da pesquisa e a assinatura do Termo de Consentimento-Livre e Esclarecido. Este trabalho foi submetido ao Comitê de Ética e Pesquisa da UPE, tendo sido aprovado sob o protocolo N°116/03. Seguindo-se à rotina laboratorial, esses dentes foram fixados em formalina a 10%, emblocados em parafina e corados com HE. As amostras fixadas foram cortadas com 5 µm e estendidas em lâminas de vidro, as quais foram desparafinizadas, hidratadas e coradas pela técnica histoquímica de B.B. e B.H. Posteriormente, os cortes foram lavados em água corrente por 10 minutos e passados em água destilada, seguindo-se os passos de desidratação, diafanização e montagem das lâminas com Entelan. Foi analisado o padrão de coloração histoquímica à microscopia da luz, individu-

almente para cada caso bem como para cada lesão estudada, sendo realizada por dois examinadores devidamente informados sobre os objetivos do estudo. De acordo com o quadro 1, considerou-se a presença de bactérias Gram positivas e negativas com o tipo de coloração

Tipo bacteriano	BB	BH
GRAM +	azul	azul
GRAM -	roxo	roxo

Quadro 1 – Especificidade das colorações histoquímicas.

RESULTADOS

B.B. – Essa coloração nos permitiu detectar a presença de bactérias em 80% (16 casos) de GP (Figura 1) e em 85% (17 casos) dos de CR (Figura 2), normalmente encontrados em meio ao tecido de granulação e no lúmen cístico, respectivamente, nas áreas de maior concentração de infiltrado inflamatório. Visualizamos, em 100% (13 casos), bactérias nas lesões cariosas identificadas nos canalículos dentinários (Figura 3). A distinção entre cocos e bacilos, em sua grande maioria, Gram positivos e negativos, não foi possível, uma vez que eles tomavam formas e localizações semelhantes. Nas lesões cariosas, pudemos distingui-las principalmente quando se foi possível visualizar os canalículos dentinários, pois elas encontravam-se nitidamente visíveis, por vezes, tornando forma de rosário com predominância de cocos em relação aos bacilos.

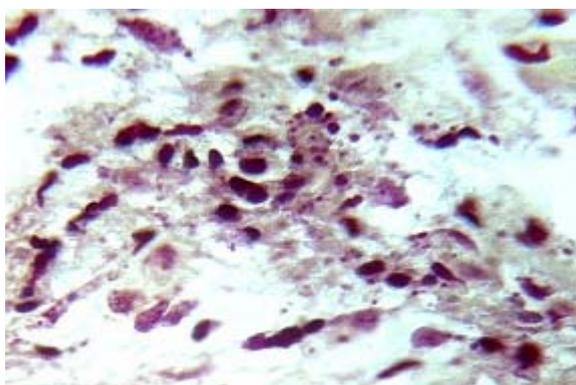


Figura 1 – Marcação positiva em GP para coloração de BB. Observar macrófago repleto de cocos (200X).

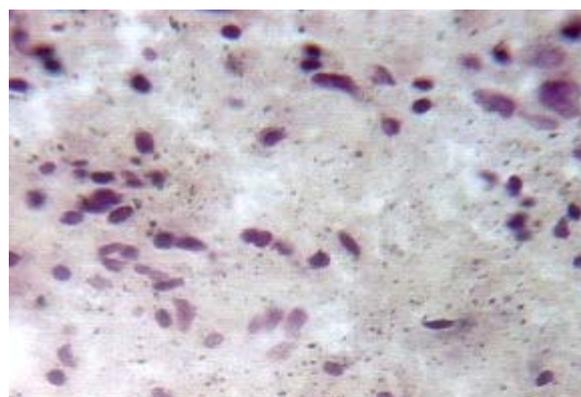


Figura 2 - Marcação positiva em CR para coloração de BB (200X).

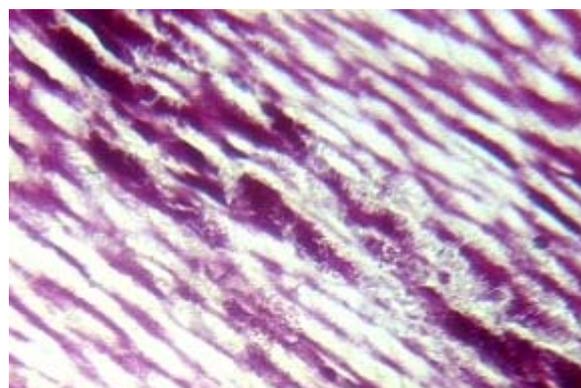


Figura 3 - Marcação positiva em cárie para coloração de BB. Observar canalículos repleto de cocos (200X).

B.H. – Nessa coloração, foi possível detectar uma frequência de bactérias que corresponderam a 80% (16 casos) dos GP (Figura 4) e 90% (18 casos) dos CR (Figura 5) que também, por sua vez, foram mais encontrados no tecido de granulação e no lúmen cístico, respectivamente, por vezes, visualizados no interior dos macrófagos. A distinção entre os tipos bacterianos e a coloração de BB só aconteceu nos casos de lesões cariosas, 92,3% (10 casos) (Figura 6), sendo as bactérias indistinguíveis nos casos de GP e CR em relação ao seu tipo e forma.

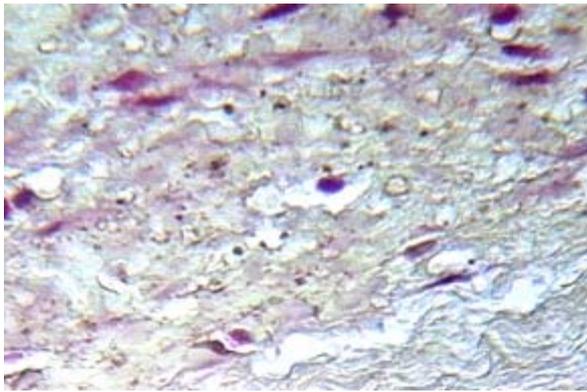


Figura 4 - Marcação positiva em GP para coloração de BH (200X).

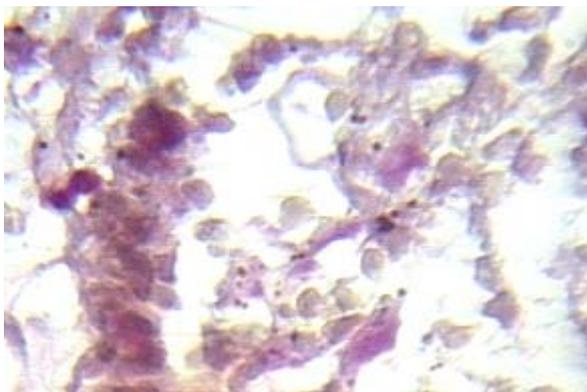


Figura 5 - Marcação positiva em CR para coloração de BH (200X).

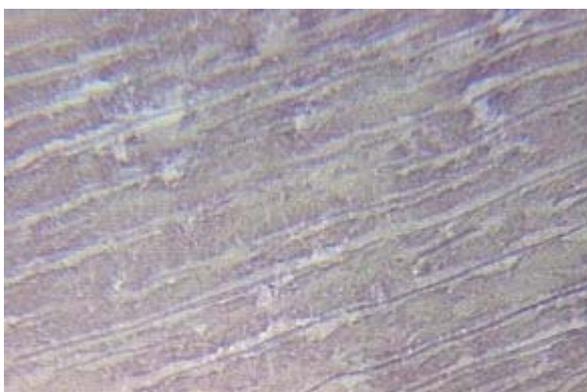


Figura 6 - Marcação positiva em cárie para coloração de BH (200X).

Houve uma correlação entre a intensidade do infiltrado inflamatório (leve, moderado e intenso) e a positividade bacteriana nos casos de lesões cariosas e periapicais, não só para a coloração de BB como também para BH, como demonstrado na Tabela 1.

Caso	BB	BH	Grau do infiltrado inflamatório
1 LC	+	+	+
2 LC	+	+	+
3 LC	+	+	++
4 LC	+	+	+
5 LC	+	+	+++
6 LC	+	+	+
7 LC	+	-	++
8 LC	+	+	+
9 LC	+	+	+
10 LC	+	+	++
11 LC	+	+	+
12 LC	+	+	+
13 LC	+	+	++
1 GP	+	-	+
2 GP	+	+	++
3 GP	-	+	+++
4 GP	+	+	++
5 GP	+	+	++
6 GP	+	-	+
7 GP	+	+	+
8 GP	+	+	+++
9 GP	+	+	++
10 GP	+	+	+++
11 GP	+	+	++
12 GP	+	+	+++
13 GP	+	+	+++
14 GP	+	+	+++
15 GP	+	-	+
16 GP	+	+	+++
17 GP	-	-	+++
18 GP	-	+	++
19 GP	-	+	+++
20 GP	+	+	+++
1 CR	+	+	++
2 CR	+	+	+++
3 CR	-	+	+
4 CR	-	-	+
5 CR	+	+	++
6 CR	+	-	+++
7 CR	-	+	+++
8 CR	+	+	+++
9 CR	+	+	+++
10 CR	+	+	+
11 CR	+	+	+
12 CR	+	+	++
13 CR	+	+	+
14 CR	+	+	++
15 CR	+	+	+++
16 CR	+	+	+
17 CR	+	+	++
18 CR	+	+	+++
19 CR	+	+	+++
20 CR	+	+	+++

BB- Brown-Brenn; BH- Brown-Hoops; (+)- marcação positiva; (-)- marcação negativa; (+)- infiltrado inflamatório leve; (++)- infiltrado inflamatório moderado; (+++)- infiltrado inflamatório intenso.

TABELA 1 – Relação das colorações utilizadas com infiltrado inflamatório.

DISCUSSÃO

A discussão na literatura a respeito da evolução do processo carioso e, conseqüentemente, formação de lesões periapicais tem como preocupação a análise, identificação dos tipos bacterianos e sua correlação causal nesse processo evolutivo. Microorganismos gram positivos e/ou negativos foram encontrados na totalidade dos casos de cárie analisados para coloração BB, numa freqüência de 92,3% para coloração BH. No entanto, essa menor proporção encontrada para a coloração BH pode ser justificada devido a uma provável falha (artefato de técnica) que tenha ocorrido durante os procedimentos laboratoriais a que foram submetidos, já que a negatividade foi observada em apenas 1 (um) caso. Já nas lesões periapicais, constatamos um percentual de 82,5% de positividade bacteriana para coloração BB e 85% para a coloração BH no total de lesões periapicais analisadas na amostra, o que justifica uma íntima relação da cárie com a formação das periapicopatias, sendo relatada anteriormente essa associação por Leonardo et al. (1994), Perez (1993) e Ricucci & Bergenholtz (2003).

Quando se refere aos microorganismos, existe uma preocupação em tipá-los, de acordo com a coloração de Gram em positivas e negativas. Várias espécies bacterianas são citadas na literatura, entretanto houve uma imensa dificuldade em distingui-las nas lesões periapicais, por se apresentarem em meio ao tecido conjuntivo e/ou de granulação, ou, ainda, epitelial, fato esse irrelevante para lesões cariosas, sendo possível identificá-las, em sua maioria, cocos, por estarem confinados aos canalículos dentinários. De acordo com essa descrição, concordam Spanó (1997), Marton & Kiss (2000), e Neville et al. (2004).

A resposta inflamatória e seus diversos graus de intensidade são estimulados pelos produtos bacterianos que irão ativar os macrófagos e, posteriormente, células inflamatórias, objetivando o extermínio dessas bactérias, constituindo-se, assim, uma forma de rea-

ção de hipersensibilidade tardia, freqüentemente em resposta aos microorganismos persistentes não fagocitados (Abbas et al., 2003) microorganismos esses de lesões cariosas as quais não foram erradicadas completamente ou estacionadas, sugerindo um processo de caráter crônico, tal como GP e CR, objetivo esse do nosso estudo. Plasmócitos, histiócitos, neutrófilos, macrófagos, por vezes repletos de bactérias e infiltrados linfocíticos, fizeram-se freqüentes nos casos de granuloma por nós estudados. Já nos casos de CR, os nossos achados exibiram: linfoplasmocitário, histiócitos, mastócitos, neutrófilos e macrófagos.

Nesse trabalho, classificamos o infiltrado inflamatório em leve, moderado e intenso. Esse critério parece melhor atender às necessidades de se estabelecerem parâmetros com a identificação de microorganismos Gram positivos e/ou negativos nas lesões avaliadas. Não só para os GP como para os CR houve uma predominância de intenso infiltrado inflamatório, que estava relacionado à prevalência de positividade para bactérias (Tabela 1). Nos casos de cárie, prevaleceu o infiltrado leve no tecido conjuntivo pulpar com 61,54%, não existindo, pois, na maioria dos casos. Tais resultados corroboram os estudos realizados por Martin et al. (2002) que, em 65 dentes cariados extraídos, observaram um percentual de 43% para o infiltrado do tipo leve.

No trabalho de Bohorquez et al. (1995) sobre lesões periapicais em que foram evidenciados o grau leve e moderado pela coloração de BB, discordando dos nossos resultados os quais, na grande maioria, se constituem pelo infiltrado inflamatório intenso para lesões periapicais.

Apesar das possíveis falhas anteriormente citadas, constatamos, para a coloração BB no total de lesões periapicais, um percentual de 82,5%, sendo 40% para GP e 42,5% para CR. Já para a cárie dentária, foi observada a positividade bacteriana na totalidade dos casos, justificando e corroborando a eficácia da coloração de BB na identificação de microorganismos

Gram positivos e/ou negativos em cavidades dentais, cárie e em polpa (Campos, 1997; Hebling et al, 1999; Murray et al, 2001; Scharts, 1989; Shimada et al, 2004; Waltimo et al, 2000), em lesões periapicais e em túbulos dentinários, deltas apicais, cementoblastos (Ribeiro, 1997), justificando, talvez, o percentual de 43,7% que obtivemos de lesões periapicais em dentes tratados endodonticamente.

No que se refere à coloração BH, obtivemos um percentual de 85% de positividade bacteriana no total de lesões periapicais, sendo 40% para GP, 45% para CR e 92,3% para cáries, concordando, dessa forma, com os estudos de Engbaek et al., (1979), os quais fizeram uso dessa técnica na análise de microorganismos Gram positivos e negativos, obtendo resultados em cárie, polpa e GP. Complementando essa análise, têm-se os trabalhos de Robey-Cafferty et al. (1989) e Schwarts et al. (1989), os quais concluíram ser essa técnica, além de fácil e rápida, bastante eficiente.

Com relação à eficiência das colorações, houve uma concordância dos nossos resultados quando se trata de lesões periapicais com os trabalhos de Engbaek et al. (1979) e Robey-Cafferty et al. (1989), os quais afirmaram ser a coloração BH mais satisfatória e eficaz para a identificação de bactérias Gram positivas e/ou negativas, embora para nós foram encontrados percentuais equivalentes para GP na coloração de BB. Já para a cárie, nossa amostra se mostrou mais eficaz para a coloração de BB, concordando com os trabalhos de Campos et al. (1997). Além das colorações por nós avaliadas nesse estudo, vale ressaltar a importância das colorações de Giemsa e Shorr para identificação bacteriana em cárie, periodontopatias, CR e GP, com satisfatória eficiência, como relatam os estudos de Duarte et al. (2003).

Há possibilidade de que pequenas alterações em nível de percentuais existam nos nossos resultados, ocasionando, dessa forma, casos falso-positivos que são justificados pela diferença no grau de infla-

ção e do dano ao tecido periapical (Holland, 1994) ou também pela ação de agentes desmineralizantes durante os procedimentos laboratoriais (van Mullem & Witnbergen, 1989).

O nosso trabalho demonstra que para melhor compreensão do processo de cárie e formação de periapicopatias, não se faz necessário somente correlacioná-las de maneira interdependente histomorfologicamente como também a análise e a identificação causal do processo de maneira paralela, fazendo opção por uma técnica correta que possa evidenciar microorganismos da melhor forma possível.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. C.; LINCHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Imunologia celular e molecular**, 4. ed. [S.l.: s.n.], 2003.
- BARBOSA, A. R.; MEDEIROS U. V. Correlação entre experiência de cárie em níveis salivares de estreptococos do grupo mutans em bebês de 6 a 3 meses de idade. **RBO**, v. 5, n. 2, maio/abr. 2002.
- BERGER, C. R. **Endodontia**. São Paulo: Pancost, 1998. 723p.
- BOHORQUEZ, S. P. ; ROCHA, R. S. S. ; ROSA, O. P. S. ; CONSOLARO, A. Avaliação da Presença e Localização de Bactérias nos Canais Radiculares e Nas Lesões Periapicais Crônicas Pelo Método de Coloração de Brown e Breen. **Revista da Faculdade de Odontologia de Bauru**, v. 3, n. 1/4, p. 25-31, 1995.
- CAMPOS, J. Penicillin-resistant meningococcus: a 12-year history? **Enferm Infecc Microbiol Clin.**, v. 15, n. 8, p.397-9, oct. 1997.
- CAMPS, J.; DEJOU, J.; REMUSAT, M.; ABOUT, I. Factors influencing pulpal response to cavity restorations. **Dent. Mater.**, v. 16, n. 6, p. 432-40, nov. 2000.

- DUARTE et al. Identificação de microorganismos em lesões periapicais: estudo histoquímico. In: **7ª Jornada de Iniciação Científica**, 10, 2003. Recife, PE: FACEPE/CMPq. 406p.
- ENGBAEK, K.; JOHANSEN, K. S.; JENSEN, M. E. A new technique for gran staining paraffin-embedded tissue. **J Clin Pathol**, v. 32, n. 2, p.187-90, Feb. 1979.
- FARGE, P. Recent findings in the etiopathogenesis of caries. **Arch Pediatr.**, v. 5, n. 10, p. 1140-4, oct. 1998.
- HEBLING, J.; GIRO, E. M.; COSTA, C. A. Human pulp response after adhesive system application in deep cavities. **J. Dent.**, v. 27, n. 8, p. 557-64, nov. 1999.
- HOLLAND, G. R. Periapical innervation of the ferret canine one year after pulpectomy, **J Dent Res.**, v. 71, p. 470-74, 1992.
- LEONARDO, M. R. et al. Evaluation of calcium hydroxide in conservative treatment of large periapical lesions. **Int Endod J.**, v. 31, n. 3, p. 203, 1994.
- MARTIN, F. E. et al. Quantitative microbiological study of human carious dentine by cultura and real-time PCR: association of anaerobes with histopathological changes in chronic pulpitis. **J Clin Microb.**, v. 40, n. 5, p. 1698-1704, 2002.
- MARTON, I. J. ; KISS, C. Protective and destructive immune reactions in apical periodontitis. **Oral Microbiol Immunol**, v. 15, n. 3, p. 139-50, jun. 2000.
- MURRAY, P. E; ABOUT, I; FRANQUIN, J. C; REMUSAT, M; SMITH, A. J. Restorative pulpal and repair responses. **Am Dent Assoc.**, v. 132, n. 4, p. 482-91, apr. 2001.
- NEVILLE, et al. Doenças da polpa e do periápice. In: **Patologia oral e maxilofacial**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004, p. 711.
- PEREZ, F. Migration of streptococcus sabguis through the root dentinal tubules. **J Endod.**, v. 19, n. 6, p. 297-301, 1993.
- RIBEIRO, F. C. Aspectos morfológicos dos biofilmes microbianos na osteomurativa e correlações endodônticas. **Revista da USP**, 1997.
- RICUCCI, D; BERGENHOLTZ, G. Bacterial status in root-filled teeth exposed to the oral environment by loss of restoration and fracture or caries—a histobacteriological study of treated cases. **Int Endod J.**, v.36, n. 11, p. 787-802, nov. 2003.
- ROBEY-CAFFETY, S. S.; RO, J. Y.; CLEARY, K. R. The prevalence of campylobacter pylori in gastric biopsies from cancer patients. **Mod Pathol.**, v. 2, p. 473-6, 1989.
- SCHWARTS, DA ET AL A modified Brown and Hopps stain for identification of gram-positive and gram-negative microorganisms in glycol methacrylate-embedded tissues **Arch Pathol Lab Med**, v.113, n.2, p.181-3, 1989.
- SHIMADA, Y. et al. Biocompatibility of a flowable composite bonded with a selfetching adhesive compared with a glass ionomer cement and a high copper amalgam. **Oper Dent.**, v. 29, n. 1, p. 23-8, 2004.
- SPANÓ, J. C.; PÉCORA, J. D.; GUERISOLI, D. **Periapicopatias** Update 29 de julho de 1997
- van MULLEM, P. J.; WITNBURGEN, M. Effect of disinfection on number and stainability of gram-positive bacteria. **Int Endod J.**, v. 22, n. 6, p. 278-82, 1989.
- WALTIMO, T.M.; ORSTAVIK, D.; SIREN, E.K.; HAAPASALO, M.P. In vitro yeast infection of human dentin. **J. Endod.**, v. 26, n. 4, p. 207-9, Apr. 2000.

WEIR, J.C.; DAVENPONT, W.D.; SKINNER, R.L. A Diagnostic and Epidemiologic Survey of 15.783 Oral Lesions. **J. Am. Dent. Assoc.**, v. 115, p. 439-442, 1987.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA

Ana Paula Veras Sobral

Rua Monte Alverne, 107/ 05

Hipódromo - Recife - PE

CEP: 52041-610

e-mail: anapaula@fop.upe.br

anapvsobral@hotmail.com

anapvsobral@yahoo.com.br