

DANIELLE ALVES DE OLIVEIRA

**Avaliação histobacteriológica da dentina após a remoção do tecido
cariado em pré-molares humanos *in vitro*.**

Dissertação apresentada à Faculdade
de Odontologia da Universidade
Federal de Uberlândia, para a
obtenção do Título de Mestre em
Odontologia. Área de Concentração
em Reabilitação Oral.

Uberlândia - 2006

DANIELLE ALVES DE OLIVEIRA

**Avaliação histobacteriológica da dentina após a remoção do tecido
cariado em pré-molares humanos *in vitro*.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do Título de Mestre em Odontologia. Área de Concentração em Reabilitação Oral.

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Gabrielli Biffi

Banca Examinadora:

Prof. Dr. João Carlos Gabrielli Biffi

Profa. Dra. Paula Dechichi

Prof. Dr. Paulo Tambasco de Oliveira

Uberlândia - 2006

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

- O48a Oliveira, Danielle Alves de, 1978-
 Avaliação histobacteriológica da dentina após a remoção do tecido
 cariado em pré-molares humanos *in vitro* / Danielle Alves de Oliveira. -
 2006.
 72 f. : il.
- Orientador: João Carlos Gabrielli Biffi.
 Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pro-
 grama de Pós-Graduação em Odontologia.
 Inclui bibliografia.
1. Cáries dentárias - Teses. I. Biffi, João Carlos Gabrielli. II.
 Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em
 Odontologia. III. Título.

CDU: 616.314-002

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

A comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado no Programa de Pós – Graduação em Odontologia, em sessão pública realizada em 29 de agosto de 2006, considerou a candidata Danielle Alves de Oliveira aprovada.

1. Prof. Dr. João Carlos Gabrielli Biffi

2. Profa. Dra. Paula Dechichi

3. Prof. Dr. Paulo Tambasco de Oliveira

DEDICATÓRIA

A Deus e aos seus mensageiros, por terem sempre me sustentado dando-me saúde, paz, vontade de vencer e aprender no decorrer desta jornada.

“Senhor é meu pastor e nada me faltará...” (Salmo 22)

Aos meus amados pais TeodoraK e Elizabeth, exemplos incansáveis de amor e dignidade. Por acreditarem em mim incansavelmente e permitir sempre que meus sonhos se realizem. A vocês obrigada, obrigada, obrigada eternamente muito obrigada.

“Honra teu pai e tua mãe por teus atos, tuas palavras, tua paciência ...” (Eclesiástico3,9)

Aos meus irmãos Emanuelle, Júnior e Gisele pela compreensão durante minhas ausências, pela fé que depositaram no meu trabalho e pelo apoio incondicional nos momentos de dificuldade.

Amo-os muito.

Ao meu amor, Anderson, homem precioso, amigo fiel e companheiro em todos os momentos. Obrigada pela paciência, tolerância e auxílio independente de hora e local.

“Ainda que eu falasse a língua dos homens e dos anjos, sem amor eu nada seria”.

(I Coríntios13,1-2)

Romilda

A minha querida sogra, amiga maternal com quem posso contar, dividir minhas angústias e aprender a superá-las, obrigada.

DEDICATÓRIA

*VEM SENTAR-TE comigo, **LÍDIA**, à beira do rio.
Sossegadamente fitemos o seu curso e aprendamos
Que a vida passa, e não estamos de mãos enlaçadas.
(Enlacemos as mãos.)*

*Amemo-nos tranqüilamente, pensando que podíamos,
Se quiséssemos, trocar beijos e abraços e carícias,
Mas que mais vale estarmos sentados ao pé um do outro
Ouvindo correr o rio e vendo-o.*

Fernando Pessoa

Obrigada, minha amada avó Lília, saudades ...

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Professor **Biffi**, mestre incondicional, capaz de expressar sua sabedoria pelo olhar.

Agradeço a oportunidade de aprendizado acadêmico e humanístico, a solidariedade nos momentos de dificuldade, o diálogo quando meu espírito se fazia sofrido e a mão que me estendeste culminando neste sonho: o de ser professora.

Professor **Rodrigo Antônio de Faria**, obrigada pelos conselhos, pelas orações, por ser dedicado e honesto ao cumprir sua tarefa de educar sagradamente. Exemplo, o qual tenho a honra de seguir.

Professora **Cristina Rink** agradeço-te pela acolhida, pelos conselhos de mestre e convivência maternal, por tantas vezes socorrer-me sem exaltar ou reclamar. Obrigada.

Professor **Roberto Bernadino**, amigo e conselheiro, meu muito obrigado.

Agradeço ...

“A experiência da amizade parece ter suas raízes fora do tempo, na eternidade. Um amigo é alguém com quem estivemos desde sempre. Pela primeira vez, estando com alguém, não sentia necessidade de falar. Bastava a alegria de estarem juntos um do lado do outro”.

(Rubens Alves)

José Alcides, Mirza, Fernanda, Flávia, Fabiana e Fúlvio
Na certeza de que os laços espirituais nos tornam uma família, obrigada por existirem e me apoiarem.

Paulinne Junqueira S. Andresen Strini
Obrigada pela amizade, orações e apoio. Se não fosse você....

Daniel Souza Zunstein
Obrigada pelo regaste nos momentos conflituosos, na medicina aplicada e solidariedade sincera.

Juliano Marques
Irmão espiritual, cuja inegável caridade ao próximo faz-se presente e irrefutável.

Kely Firmino Bruno
Obrigada pelas orações, conselhos e auxílio. Amiga fiel e eterna que fiz nesta jornada.

Giselda Lemes
Funcionária exímia e amiga. Obrigada por ter tornado a secretaria um lugar acolhedor a tantos alunos que estão distantes de casa.

Francielle Alves Mendes
Obrigada pelo apoio, amizade fraternal e conselhos.

Camilla Christian Gomes Moura
Obrigada pela orientação positiva e pelos primeiros passos na caminhada rumo ao mestrado.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia, na pessoa do Digníssimo Diretor Prof. Dr. **Alfredo Júlio Fernandes Neto**.

Ao Curso de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia por meio de seu Coordenador Prof. Dr. **Carlos José Soares**.

Ao Curso de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia, o qual proporcionou-me a bolsa anual de monitoria.

Ao Prof. Dr. **Paulo Tambasco Oliveira**, que permitiu a utilização do laboratório de Histologia da Área de Ciências Morfológicas da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade Federal de São Paulo.

Aos técnicos **Nilce de Oliveira Wolga e Dimitrius Leonardo** do laboratório de Histologia da Área de Ciências Morfológicas da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade Federal de São Paulo pela realização e demonstração da técnica de coloração de Gram, modificado por Brown e Brenn.

Aos funcionários da Biblioteca – Campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia, pelos préstimos e esclarecimentos.

LISTA DE ABREVIATURAS E NOTAÇÕES

Abreviaturas

UFU – Universidade Federal de Uberlândia

μm - micrometro (milésima parte do milímetro = 10^{-3} milímetros)

mm - milímetro

mm^2 - milímetro quadrado

ml - mililitro

nm - nanômetro

1 milimícrom = $10^{-3}\mu\text{m}$ = 10^{-6}mm

Notações

□ marca registrada

μ micro ou micron ou micrômetro

= igual

% porcentagem

e -

°C graus Celsius

X vezes

-X raios X

LISTA DE FIGURAS

Tabela 1	40
Quadro1	41
Quadro2.....	42
Gráfico1.....	43
Gráfico2.....	44
Figura 1.....	45
Figura 2.....	46
Figura 3	47
Figura 4.....	48
Figura 5.....	49
Figura 6.....	50

ANEXOS

Anexo 1.....	67
Anexo 2.....	68
Anexo 3.....	70
Anexo 4.....	71

SUMÁRIO

Resumo	12
Abstract	13
1. Introdução	14
2. Revisão de Literatura	17
3. Proposição	34
4. Material e Métodos.....	35
5. Resultados.....	39
6. Discussão	51
7. Conclusões e Considerações finais.....	59
8. Referências	60
9. Anexo	67

RESUMO

A presente pesquisa teve como objetivo realizar análise histobacteriológica da dentina remanescente de pré-molares humanos após a remoção do tecido cariado, quanto à presença, localização e distribuição dos microrganismos nos túbulos dentinários em diferentes graus de profundidade da lesão cariosa. Foram selecionadas lâminas histológicas representativas de cortes histológicos seriados de 20 dentes, obtidos durante a pesquisa de Biffi et al. (1982), extraídos de pacientes de ambos os gêneros e faixa etária entre 20 a 40 anos. Estes dentes apresentaram cárie proximal e/ou oclusal e a remoção do tecido cariado foi realizada *in vitro*. As três faces do dente (mesial, distal e oclusal) foram clinicamente classificadas quanto à profundidade de cárie em graus 0, 1, 2, 3, 4 ou 5 e microscopicamente avaliadas. As lâminas foram coradas pela técnica Hematoxilina e Eosina, Tricrômico de Masson e histobacteriológico de Gram, modificado por Brown e Brenn. A análise dos cortes histológicos foi realizada utilizando o microscópio de luz. Na análise histológica foi observada a presença bacteriana superficial e/ou profunda nos túbulos dentinários tanto no assoalho pulpar quanto na junção amelo-dentinária, bem como a presença de nichos bacterianos no preparo cavitário. Os túbulos contaminados apresentavam-se morfolologicamente inalterados e na exposição pulpar, durante a remoção profunda da cárie, constatou-se a introdução de fragmento dentinário contaminado no tecido pulpar. Para análise estatística do número de microrganismos, foi aplicado o coeficiente de correlação de Pearson, respectivamente entre os diferentes graus de cárie e localização na junção amelo-dentinária e assoalho pulpar. Conclui-se que, em 56,7% das faces cariadas os microrganismos encontravam-se situados na dentina considerada clinicamente como sadia, os quais alojavam-se em túbulos dentinários morfolologicamente inalterados; a localização e a distribuição dos microrganismos nos túbulos foi variável e independente da profundidade da cárie.

Palavras - chave: cárie coronária, túbulos dentinários, microrganismos.

ABSTRACT

The present research had the objective to analyze qualitatively through histobacteriology, the remaining dentine of upper human premolars after removal of clinically decayed tissue, according to presence, location and distribution of microorganisms in dental tubules in different degrees of depth of carious lesion. It was selected representative histological blades of histological cut in series, obtained during the research of Biffi et al (1982), extracted from patients of both genera and age from 20 to 40 years old. The teeth should present proximal caries and/ or occlusal caries and the removal of decayed tissue would be done *in vitro*. The three faces (dental, mesial and occlusal) were clinically classified according to the depth of the caries in degrees 0, 1, 2, 3, 4 or 5 and microscopically assessed. The blades were tinged using the technique of Hematoxylin and Eosine, Trichrome of Masson and histobacteriological of Gram, modified by Brown and Brenn. The interpretation of histological cuts was realized with the use of a trinocular and photomicroscope. In the descriptive analysis it was possible to check the bacterial penetration in a superficial way and/ or in a deep way in the dentinal tubules both in the pulpal floor or in the amelodentinal junction, as well as the presence of bacterial niches in the cavity preparation. The contaminated tubules showed morphologically unaltered, and in pulp exposure during the removal of deep caries it was verified the introduction of a contaminated dentinal fragment in the pulp tissue. In order to have a statistical analysis of the number of microorganisms, it was applied the Pearson's correlation coefficient, respectively among the different degrees of caries and localization in the amelodentinal junction and pulp floor. It was brought to a conclusion that, in 56,7% of the decayed faces the microorganisms were placed in dentine considered clinically healthy, in which they lodged in dentinal tubules morphologically unaltered; the localization and the distribution of microorganisms in the tubules were variable and independent of the depth of the caries.

Key words: coronary caries, dentinal tubules, microorganisms

1. INTRODUÇÃO

A presença do microrganismo é um dos fatores condicionantes para a instalação da lesão cariosa e patologia pulpar. Desta forma, a sua determinação, o seu conhecimento e a sua localização na dentina representam fatores importantes na escolha de um processo de controle microbiano, os quais constituem a problemática de estudo no presente trabalho.

Em 1881, Underwood e Millis relataram a existência das bactérias micrococcos em formas ovais e de bastonetes, em corte de dentina cariada. Os autores mostraram que a população bacteriana diminuía em direção às camadas mais profundas da lesão cariosa, sobre cujo assunto muitas investigações têm sido feitas com a finalidade de esclarecerem a microbiota da cárie dentinária profunda e os possíveis efeitos destes microrganismos na dentina intacta ou descalcificada, bem como, na polpa dentária.

Posteriormente à evolução das técnicas de identificação dos microrganismos, constatou-se que as infecções presentes nos túbulos dentinários eram mistas, com predominância de bactérias anaeróbicas, em especial as Gram-positivas. As bactérias encontradas nestas infecções polimicrobianas exercem função primordial na produção de enzimas e endotoxinas, sendo responsáveis por diferentes reações que podem potencializar a infecção, porquanto promovem a inibição da quimiotaxia dos neutrófilos e fagocitose, assim como garantem a migração de enzimas lisossômicas e ainda participam da resposta imunológica do sistema complemento (C 3 e C 5) além de induzir a produção de anticorpos (Baumgartner, 1992).

A polpa inflamada devido à cárie exhibe aumento de imunoglobulinas, as quais sugerem que os produtos tóxicos dos microrganismos são imunogênicos (Speer, 1977), pois a reação antigênica e a liberação de mediadores da inflamação pulpar, causadores de distúrbios circulatórios (Van Hassel, 1977), podem acometer integralmente a polpa.

Biffi et al. (1982), ao avaliarem a presença de microrganismos na dentina, constataram que, paradoxalmente, a intensidade da inflamação não se correlacionava à profundidade dos microrganismos, e sim a frequência destes.

Das 134 faces cariadas avaliadas pelos autores, não foi verificada inflamação pulpar em cárie de esmalte, a qual ocorreu a partir do grau dois, e sua frequência aumentou com a profundidade, apesar da intensidade ter variado independentemente da localização do microrganismo até à cárie de grau cinco, em que já ocorria exposição pulpar.

A dinâmica entre microrganismo, virulência e resposta orgânica representa incentivo para o desenvolvimento de pesquisas que proporcionem explicações e definições mais compreensíveis e convincentes da íntima relação entre microbiologia e patologia, (Estrela, 1997).

A literatura relata a persistência de microrganismo na dentina mesmo após a remoção clínica da cárie (King, 1965; Crone, 1968; Langeland & Langeland, 1968; 1981). A escavação como meio de remoção dos Gram-positivos acidogênicos e acidúricos viáveis mostrou-se ineficaz no estudo de Lichtengerg- Crone (1963), em que se utilizou os métodos bacteriológico e histológico na camada dentinária cariada .

Parkh et al. (1965) demonstraram que os estreptococos que estão intimamente relacionados com cárie da dentina profunda, possuem a habilidade de produzir a hialuronidase. Mediante análise histoquímica, Toto (1967), Toto & Prendergast (1968) confirmaram a descoberta acima e concluíram que o processo destrutivo da dentina nos dentes cariados é caracterizado pela perda de ácidos e mucopolissacarídeos neutros liberados no interior dos túbulos mediado pela hialuronidase, produzida principalmente, pelos estreptococos, invasores da dentina.

Algumas avaliações registraram dentina clinicamente intacta sob a lesão cariosa, confirmadas pela ausência de qualquer microrganismo inerente à lesão (Miller, 1890; Stephan et al. 1943; Macgregor et al. 1956; Fusayama, 1966).

Dorfman et al. (1943); Jolly & Sullivan (1960) verificaram a ausência de microrganismos cultiváveis na dentina saudável, no entanto constatarem o crescimento de bactérias em amostras de lesões moles descalcificadas, evidenciando na região parcialmente descalcificada, que o número de microrganismos cultiváveis é inferior que o

da totalidade da lesão (Burnett & Scherp, 1951a; 1951b).

Biffi et al. (1983), observaram que os microrganismos situados profundamente na dentina clinicamente sadia e perceptíveis apenas em exames laboratoriais poderiam dificultar o diagnóstico clínico da real profundidade da cárie. Tal fato acorda a Reeves & Stanley (1966) quando da mensuração entre a profundidade de microrganismos e a polpa, pela comprovação por exames histológicos de que o grau de comprometimento pulpar era proporcional à quantidade de dentina remanescente, apesar da presença de dentina reacional reduzir, mas não impedir a inflamação pulpar. Além do que, a mesma poderia estar contaminada por bactérias, o que sugere sua permeabilidade, evidência consonante ao estudo de Langeland (1963).

Kronfeld (1955) e Shovelton (1970) afirmaram que não é possível determinar por meio do exame clínico do assoalho pulpar, se os microrganismos foram totalmente eliminados, pois sob restaurações bem realizadas os mesmos podem desaparecer gradualmente. Entretanto, se ocorrer infiltração pela interface dente-restauração, Langeland (1976) afirma que os microrganismos latentes, em condições propícias, podem proliferar quando exibirem membrana plasmática íntegra.

Mediante os estudos efetuados, faz-se mister e justificável analisar a presença, distribuição e localização dos microrganismos na dentina remanescente de pré-molares humanos após a remoção do tecido cariado, com vista a subsidiar cientificamente novos esforços em prol da adequação do controle microbiano.

Para tanto, importa a somatória do esmero clínico na remoção do tecido cariado, da efetuação de restaurações tecnicamente corretas, com identificação e incorporação de componentes inibitórios microbianos em materiais de saúde oral ampla e de uso específico do profissional em odontologia.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Para melhor desenvolvimento do tema, no capítulo revisão de literatura fez-se, inicialmente uma descrição da morfologia e constituição orgânica do tecido dentinário nas suas condições fisiológicas, com a descrição do microrganismo quanto às suas características morfoestruturais e seu potencial antigênico. Finalizando, foram abordados os efeitos dos agentes histológicos desmineralizantes e sua influência na capacidade de coloração das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

2.1. Morfologia dentinária

A dentina é um tecido mineralizado de natureza conjuntiva que constitui a maior parte da estrutura do dente, sendo recoberta pelo esmalte na porção coronária e pelo cemento na porção radicular. Aloja em seu interior um tecido conjuntivo não mineralizado, a polpa dentária, com o qual possui muitas características similares referentes à origem, relação topográfica e função. Por esta razão, estes dois tecidos são intimamente relacionados, constituindo-se o complexo dentina-polpa (Arana & Katchburian, 1999).

A dentina compõe-se de 70,0% de hidroxiapatita, 18,0 % de material orgânico e 12,0% de água. Sua estrutura tubular confere-lhe a propriedade de resiliência, importante na sustentação do esmalte.

Os túbulos dentinários são pequenos túbulos que se formam com resultado da mineralização da matriz dentinária ao redor dos prolongamentos odontoblásticos que podem atravessar toda a extensão da dentina, desde a polpa até a junção amelo-dentinária ou à junção amelo-cementária (Trowbridge & Kim, 2000).

A forma tubular, com ligeira conicidade, possui a abertura de maior diâmetro voltado para a superfície pulpar com cerca de 3 μm , enquanto os diâmetros dos túbulos dentinários na superfície externa da dentina possuem em média 1 μm (Gulabivala, 1996). Tais túbulos encontram-se interligados por ramificações laterais em toda a dentina, as quais

denominam-se de canalículos e possuem, cerca de 1 μ m de diâmetro e estão dispostas em ângulo reto com os túbulos dentinários (Ten Cate, 1988).

Segundo Carrigan et al. (1984), o número e o diâmetro dos túbulos dentinários depende da região da dentina analisada, coronária ou radicular, como também da idade fisiológica do dente. Os dentes de pessoas na faixa etária entre 20 e 34 anos tinham, em média, 242.775 túbulos, enquanto os possuidores de mais de 80 anos apresentavam cerca de 149.025. Quanto à região dentária, foram encontradas as seguintes médias de túbulos por milímetro quadrado: 8.190 túbulos por milímetro quadrado (túbulos/ mm²) na região apical; 39.101 túbulos/ mm² na região média radicular; 42.360 túbulos/ mm² na região cervical e 44.243 túbulos/ mm² na região coronária.

Em relação aos túbulos dentinários coronários, Garberoglio & Brännström (1976) observaram variações dependentes da distância à polpa. Na parede pulpar, esses autores relataram existir entre 30.000 a 52.000 túbulos/mm² e na dentina analisada a uma profundidade de 3,5 mm da polpa esse número de túbulos variou de 10.000 a 25.000. Quanto às médias de túbulos/ mm², os autores encontraram 45.000 próximos à polpa e, 19.000 do esmalte.

Kennedy et al. (1986) encontraram diferenças entre pré-molares jovens e os fisiologicamente envelhecidos quanto à distribuição de túbulos por área e aos seus diâmetros, com análise as fotomicrografias com aumentos de 300 e 3000X.

Quanto aos diferentes tipos de dentina constituintes da estrutura dentária, sabe-se que existem diferenças quanto à composição orgânica e inorgânica, entre aquela que reveste internamente o túbulo e a que se situa nas regiões entre um túbulo e outro (Gulabivala, 1996).

A dentina depositada ao longo da parede interna de cada túbulo dentinário denomina-se dentina peritubular (Trowbridge & Kim, 2000). Segundo Garberoglio & Brännström (1976), sua formação progressiva é responsável pela diminuição contínua do

diâmetro dos túbulos na direção do esmalte ou do cimento, caracterizando a forma cônica de cada túbulo dentinário.

A dentina peritubular é mais mineralizada e possui menor quantidade de fibrilas colagênicas do que a dentina intertubular (Trowbridge & Kim, 2000). Gulabivala (1996) afirmou que essa dentina hipermineralizada das paredes internas do túbulo é que garante rigidez e maior apoio estrutural à massa dentinária.

Quanto à espessura peritubular, Ten Cate (1988) relatou ser, aproximadamente, de 400 milimícrons próximo à polpa e por volta de 750 milimícrons junto ao limite amelo-dentinário.

A massa dentinária, que permeia o túbulo corresponde à dentina intertubular, sendo 40,0% menos mineralizada que a peritubular e com conteúdo orgânico composto principalmente de fibrilas colágenas (Trowbridge & Kim, 1998).

A porção mais interna da dentina que se encontra em contato direto com a polpa é composta exclusivamente por matriz orgânica e denomina-se pré-dentina. Possui em torno de 25 a 30 µm de espessura e pode ser observada durante toda a vida do dente enquanto há polpa viva (Ten Cate, 1988).

2.2. Formação da matriz orgânica da dentina

A matriz orgânica da dentina compõe-se de fibrilas colágenas e substância fundamental interfibrilar (Arana & Katchburian, 1999).

Nos dentes humanos o colágeno intratubular revela-se como característica importante da dentina e ocorre em maior quantidade na dentina intertubular. O colágeno preenche quase integralmente significativo número de túbulo o que pode fundamentar a idéia da variabilidade da extensão do processo odontoblástico (Ten Cate, 1999).

O padrão de deposição de colágeno é comum a todas as categorias dentárias, contudo não se relaciona com a idade do dente sendo o presente na dentina principalmente do tipo I que corresponde a 85% da matriz orgânica, enquanto os tipos V e III representam proporção em torno de 5,0%.

Os 10% restantes da matriz orgânica são constituídos pelas chamadas proteínas não colágenas tais como: fosforinas, fosfoproteínas, sialoproteínas dentinárias, proteínas morfogenéticas dentinárias, Gla-proteínas (osteocalcina), proteoglicanas, glicoproteínas ácidas (osteonectina) e proteínas séricas (Arana & Katchburian, 1999).

Ten Cate (1999) considera, ainda que, além dos prolongamentos odontoblásticos, do colágeno e fibras nervosas, existe a presença de um hidrogel constituído de proteoglicanos, tenascina, fibronectina, albumina do soro, alfa 2 HS e transferrina (em proporções diferentes da encontrada no soro), que se apresenta sob forma de uma rede densa e com pouca condutividade hidráulica, a qual é potencializada cerca de 3000X pela degradação enzimática do respectivo gel.

Em condições normais, o tecido pulpar apresenta-se protegido de agressões externas pelo seu isolamento anatômico (Bammann & Estrela, 1999). Entretanto, sempre que a dentina é exposta por perda de esmalte ou cimento, a polpa é colocada em risco devido à alta permeabilidade desse tecido, conferida pela presença dos túbulos dentinários (Pashley et al. 2002). Essa permeabilidade aumenta com a proximidade do tecido pulpar, devido ao maior diâmetro e densidade tubular, facilitando a difusão de resíduos metabólicos, enzimas e toxinas bacterianas, provenientes do processo carioso (Bergenholtz, 1981) e de componentes tóxicos liberados pelos materiais restauradores (Costa et al. 2002).

A resposta pulpar inicial resulta no aumento do fluido dentinário e macromoléculas (Maite et al. 1981) para o exterior, que reduz a difusão de estimuladores nocivos através dos túbulos dentinários e auxilia na limpeza da dentina.

A continuidade da agressão resulta na ativação de células imunocompetentes, processos inflamatórios na polpa e redução da permeabilidade dentinária pela presença de dentina reparadora ou por deposição de proteínas do fluido dentinário (Hahn et al. 1997).

Conseqüentemente fatores de crescimento (TGF- β - transforming growth factor- β) presentes na matriz dentinária poderiam ser liberados e estimulariam as células odontoblásticas a sintetizarem dentina reacional, o que facilitaria a obliteração dos túbulos e redução da permeabilidade dentinária (Smith et al. 2003).

A presença do fluido que percorre os túbulos dentinários é fundamental para a manutenção da sensibilidade e propriedades mecânicas da dentina, porém, sua composição não é totalmente conhecida, sendo considerado um ultrafiltrado do sangue, portador de albumina e imunoglobulina G (IgG). É provável que a composição do fluido supracitado se altere mediante certas condições clínicas, particularmente quando a polpa apresentar-se danificada ou inflamada (Love et al. 1997).

O fibrinogênio, molécula importante na hemostasia está presente no fluido dentinário após preparo cavitário. Assim, a deposição de albumina, fibrinogênio ou IgG nos túbulos reduz a presença de fluidos através da dentina (Hahn et al. 1997).

Os mecanismos bacterianos envolvidos na invasão da dentina não são bem conhecidos (Love et al. 1997). Os túbulos dentinários contêm apreciáveis quantidades de colágeno não mineralizado (Dahlén et al. 2000).

No entanto existem estudos sugestivos de que o colágeno, tipo I, seja reconhecido pelos estreptococos orais e quando acoplado a uma superfície de hidroxiapatita pode servir como um substrato de adesão (Liu et al. 1990). As interações envolvem a adesão celular e respostas de crescimento são mediadas por proteínas da superfície celular bacteriana específica.

Love et al. (2002), os autores propuseram que o entendimento do mecanismo de invasão bacteriana no túbulo contribuísse para a obtenção de novas estratégias de controle.

Necessita-se, no entanto, identificar as substâncias que mediam as interações iniciais da bactéria com a dentina e valer-se, por exemplo, de agentes bloqueadores do antígeno polipeptídico tipo I/II - o qual reconhece o colágeno – ou, por meio do bloqueio das propriedades co-adesivas do referido antígeno.

2.3. Características da citologia bacteriana e seu potencial antigênico

A invasão bacteriana nos túbulos dentinários é um fator preponderante na patogênese da cárie dentária e doença pulpar. O papel biológico das bactérias, particularmente relacionado aos mecanismos de agressão e à reação do hospedeiro pode ser mais bem entendido a partir do conhecimento da estrutura e ultra-estrutura celular (Bammann & Estrela, 1999).

A bactéria constitui-se estruturalmente por: envelope celular (parede celular e membrana citoplasmática), estruturas internas ao envelope celular (citoplasma, material genético e endósporo) e estruturas externas ao envelope (glicocálice, flagelo, *pilus* - fímbrias - e estruturas fibrilares).

As formas das bactérias podem ser observadas através da coloração de Gram que as dividem em dois grupos: Gram-positivas e Gram-negativas. A técnica de Gram expressa diferentes características bacteriológicas especialmente referente à composição química, estrutura, permeabilidade da parede celular, fisiologia, metabolismo e patogenicidade (Burnett & Schuster, 1982; Nisengard & Newman, 1994).

A parede da bactéria Gram-negativa é constituída por estruturas de múltiplas camadas complexas não retentoras do corante quando submetida a solventes solúvel que a torna descolorada, ao passo que, ao ser submetida a outro corante adquire nova coloração.

Contrariamente, a parede da célula Gram-positiva consiste de uma única camada que retém o corante aplicado, mas não se sujeita a nova coloração pelo segundo corante.

Esta parede constitui-se por um polímero denominado peptidoglicano, composto de unidades de natureza glícida e peptídica de espessura que varia entre 20 a 50 nm.

Além do peptidoglicano, integram esta estrutura os ácidos teicóicos, compostos por ribitol ou glicerolfosfato. Os ácidos teicóicos relacionados à membrana são de natureza do glicerolfosfato e denominados ácidos lipoteicóicos.

O glicolípido e o ácido lipoteicóico se ligam às membranas celulares, particularmente de linfócitos e macrófagos, resultando em ativação celular. São capazes, também, de ativar a cascata do complemento, o que resulta na indução inflamatória pulpar e periapical (Dahlén & Bergenholtz, 1980).

A parede celular da bactéria Gram-negativa consideravelmente mais complexa apresenta uma camada de peptidoglicano com espessura de 3 a 8 nm. O espaço periplásmico consiste de duas membranas, a externa e a citoplasmática, e nele estão concentradas enzimas hidrolíticas e proteínas de ligação que participam do mecanismo nutritivo da célula.

A membrana externa é semelhante à citoplasmática, contudo a externa apresenta menor quantidade de fosfolípidios e proteínas. Por envolver o corpo bacteriano conjuntamente ao peptidoglicano, ao qual ligam-se moléculas lipoprotéicas, determina integridade à célula.

Outro constituinte da parede, a endotoxina lipopolissacárideo (LPS), localiza-se na camada externa da membrana externa das Gram-negativas e compõe-se de três segmentos covalentemente ligados: Lipídio A, Core e Antígeno O, cuja virulência, determina efeitos biológicos que resultam na amplificação das reações inflamatórias. Também induz os macrófagos a secretarem as interleucinas (IL-1, IL-6 e IL-8), fator alfa de necrose tumoral (TNF), oxigênio reativo, nitrogênio intermediário (óxido nítrico), interferon, fatores ativadores de plaquetas e prostaglandinas.

Mesmo quantidades pequenas de LPS são capazes de induzir a resposta inflamatória periapical. Uma possível explicação para a multiplicidade de achados com a mesma é a variabilidade genética do LPS entre diferentes microrganismos (Estrela & Pécora, 1997).

Warfvinge et al. (1985) realizaram um estudo histológico em que correlacionaram a resposta pulpar frente à aplicação de LPS liofilizado, em cavidades classe V realizadas em 20 dentes de macacos. Na análise histológica dos cortes dos túbulos dentinários subjacentes à aplicação do antígeno bacteriano, verificou-se indução de infiltrado linfocitário no tecido pulpar da maioria dos dentes testados. A verificação dos dados indica que a presença de endotoxina de alto peso molecular atua como antígeno e pode afetar negativamente a polpa, quando presente nos túbulos dentinários.

Outra observação relatada pelos autores foi que as bactérias Gram-negativas predominavam sob restaurações dentinárias quando apresentavam microinfiltração. Estas bactérias ocasionam múltiplos efeitos patogênicos através da endotoxina LPS. Não obstante, o tamanho das moléculas permeantes pudesse ser fator decisivo na invasão.

Pashley et al. (1977; 1983) também verificaram que o alto peso e a dimensão da molécula são determinantes na permeabilidade dentinária. As moléculas testadas por estes autores foram relativamente menores em comparação com os complexos de alto peso molecular do estudo de Warfvinge et al. (1985).

Estreptococos do grupo *mutans* e lactobacilos são microrganismos oportunistas comuns na cavidade bucal e patogênicos em condições ambientais favoráveis, frequentes na dentina cariada e facilmente detectados por meio de métodos microbiológicos. Indubitavelmente ocorre a presença de microrganismos nos túbulos dentinários durante o avanço das cáries com possibilidade de injúria pulpar. Contudo, a viabilidade dos microrganismos faz-se controversa, devido à relação entre a desmineralização da dentina, a localização da bactéria e a resposta pulpar (Jubach & Langekand, 1981).

Jubach & Langekand, 1981, em estudo para determinação da viabilidade dos microrganismos por avaliação morfológica em microscopia eletrônica encontraram bactérias após a remoção clínica da cárie com membrana de três unidades e glicoproteínas espalhadas, indicativo de organismos vitais. Ainda na determinação do efeito do capeamento pulpar indireto foram constatadas em cortes histológicos corados pelo método de Brown e Brenn bactérias na dentina dura, após a remoção de toda a dentina amolecida.

Na literatura parece não haver um consenso sobre a correlação entre coloração, textura da dentina e número de microrganismos detectados na lesão (Duque, 2006). Enquanto alguns investigadores relacionaram o escurecimento ou a dureza da dentina com a menor proporção de bactérias (Bjordnal et al. 1997; Bjordnal & Larsen, 2000; Maltz et al. 2002) outros não constataram essa associação (Kidd et al. 1993 Ricketts et al. 1995; Bonecker et al. 2003).

A reação de Maillard que ocorre entre carboidratos e proteínas tem sido proposta como a causa do escurecimento das lesões de cárie dentinária, uma vez que nas mesmas foram detectados pigmentos marrons quimicamente semelhantes aos produzidos nesse tipo de reação.

O escurecimento da dentina remanescente pode estar associado à oxidação dos produtos iniciais da reação de Maillard ou à reação de pequenos aldeídos derivados de bactérias com proteínas formando polímeros com coloração mais acastanhada (Kleter et al. 1998). Essas alterações na coloração, textura e umidade da dentina sejam mais nítidas clinicamente para os dentes com cárie ativa e não devem ser consideradas isoladamente na determinação do sucesso do tratamento.

Além disso, a avaliação clínica da dentina varia conforme critérios táteis e visuais inerentes a cada investigador. Quando os clínicos removem a dentina cariada normalmente guiam-se pelas próprias respostas sensoriais e experiência clínica.

Shimizu et al. (1982) desenvolveram um estudo com o objetivo de avaliar a confiabilidade da escavação guiada por um explorador especial, designado *tug back*, através do exame da dureza da dentina remanescente após escavação. A *tug back* (puxão/arranco) os autores definiram como força requerida para desalojar a ponta do explorador inserido na dentina amolecida, a qual foi medida com a utilização de um aparelho composto por um explorador especial, uma peça de mão, um amplificador de força e um oscilatório.

O *tug back* reduziu-se progressivamente à medida que a escavação era realizada e quase desapareceu ao deparar-se com uma dureza dentina de 23.3 KHN. Ao escavar-se utilizando apenas a resposta sensorial a dureza média da dentina remanescente fora de 22.8 KHN com desvio padrão de 9.8 KHN, enquanto na utilização *tug back* o mesmo foi 5.7 KHN. Este resultado mostrou que a escavação guiada por *tug back* foi superior na remoção confiável da dentina amolecida.

Shimizu et al. (1982) ainda acrescentaram que a dentina amolecida pode ser dividida em camada de superfície e camada profunda ambas separadas pela dureza crítica e que deve ocorrer a conservação da camada profunda, visto que esta é leve ou moderadamente descalcificada, contém pouco ou nenhum microrganismo e endurecer-se-á culminando com esterilização por tratamento adequado de capeamento pulpar.

Entretanto, estudos têm verificado que, embora a dentina infectada seja conhecida por sua elevada concentração de microrganismos, grande número de bactérias ainda persistem na dentina mais interna (Bjorndal et al. 1997; Bjorndal & Larsen, 2000).

Duque (2006) ao avaliar a efetividade clínica e microbiológica do tratamento pulpar indireto utilizando-se dois cimentos de ionômero de vidro modificados por resina e um cimento de hidróxido de cálcio observou, para todos os grupos de materiais, que não houve redução na quantidade de estreptococos do grupo *mutans* e lactobacilos viáveis.

Apesar disso, alterações significantes na textura da dentina foram observadas, ratificando o exposto anteriormente de que possa não existir correlação entre esse aspecto clínico e a redução da microbiota (Bonecker et al. 2003).

Para evitar irritação ou até danos irreversíveis ao tecido pulpar causados pela difusão de agentes tóxicos, materiais denominados protetores pulpares são indicados para forramento de cavidades profundas com reduzida espessura de dentina remanescente, os quais devem ser biocompatíveis quando aplicados em dentina e capazes de permitirem e/ou estimularem a reparação tecidual (Costa et al. 2002), além de promoverem um bom selamento da interface dente-restauração, diminuindo a possibilidade de microinfiltração bacteriana.

Uma importante propriedade do material protetor pulpar é apresentar atividade antibacteriana, principalmente quando utilizado sobre a dentina contaminada em dentes com indicação de tratamento pulpar indireto. Neste procedimento é preconizada a reabertura do dente alguns meses após o procedimento para remoção da dentina cariada remanescente devido à possibilidade de desenvolvimento de infecção pulpar pela presença de bactérias residuais (Bjorndal et al. 1997).

Alguns autores, contudo, têm sugerido a realização do tratamento em uma única sessão, pois relataram alta prevalência de sucesso clínico e radiográfico (Falster et al. 2002; Maltz et al. 2002), além da redução significativa no número de colônias bacterianas presentes na dentina residual (Bjorndal & Larsen 2000), após meses de acompanhamento do tratamento.

Segundo Maltz et al. (2002), os resultados microbiológicos indicaram que a remoção superficial da cárie, o forramento com um material antibacteriano e o selamento da cavidade reduziram o metabolismo e o crescimento bacteriano ao desacelerar a progressão da lesão e favorecer a resposta do complexo dentino-pulpar.

Entretanto, existem estudos que demonstraram a sobrevivência de estreptococos bucais, mesmo após meses ou anos da remoção parcial da dentina contaminada e selamento dentário (Bjorndal et al. 1997; Bjorndal & Larsen 2000), daí a inferência da existência de cepas resistentes ao tratamento (Bjorndal et al. 1997; Bjorndal & Larsen 2000; Kreulen et al. 1997; Weerheijm et al. 1999).

A distribuição e persistência de *Streptococcus mutans* em diferentes sítios dentários na mesma cavidade bucal foram verificadas por Redmo Emanuelsson et al. (2003). A capacidade das bactérias sobreviverem e persistirem em um determinado ambiente depende, em parte, de sua plasticidade genética inerente, que determina sua habilidade em responder a flutuações nas condições do ambiente e ao estresse (Dobrint & Hacker, 2001).

Uma rápida resposta adaptativa foi exibida por *S. mutans*, em um processo de síntese de proteínas específicas (Hamilton & Svensäter, 1998), a qual poderia ser induzida pelos ácidos produzidos nas reações químicas dos materiais ou pelo próprio metabolismo das bactérias que interagem no ambiente de estudo.

Na ocorrência da acidificação do ambiente, as bactérias produzem uma variedade de medidas protetoras, incluindo sistemas que alteram a composição da membrana celular, a extrusão de prótons e as vias metabólicas (Cotter & Hill, 2003).

A sobrevivência das bactérias ácido-resistentes, como *S. mutans*, sob restaurações também pode relacionar-se à capacidade de metabolização de carboidratos, provindos de glicoproteínas do soro, presentes no fluido dentinário, como ácido siálico, galactose e N-acetilglicosamina (Paddick et al. 2005).

Embora o selamento favoreça a redução do teor de oxigênio do ambiente, *S. mutans*, por serem considerados microrganismos anaeróbicos facultativos (aerotolerantes), não são influenciados por essa mudança, pois podem crescer na presença ou ausência de oxigênio.

De modo contrário, o ambiente anaeróbio exclui os microrganismos dependentes do oxigênio e reduz os que crescem melhor na sua presença, facilitando a proliferação de espécies como *S. mutans* (Thomas & Pera, 1983).

S. mutans apresenta a habilidade de resistir às alterações nos níveis de ácidos produzidos no ambiente bucal, protegendo assim seus constituintes orgânicos, em especial o DNA, dos efeitos agressivos da acidificação (Quivey, et al. 2001).

Paddick et al. (2005) detectaram distintas linhagens de *Streptococcus oralis* e *Actinomyces naeslundii*, após cinco meses da remoção parcial da cárie dentária, embora com reduzida diversidade genotípica/fenotípica em comparação às linhagens isoladas previamente ao tratamento.

Wambier (1998) avaliou a viabilidade bacteriana e a existência de possíveis inibições seletivas sobre as principais bactérias, após selamento com ionômero de vidro resinoso por meio de estudo microbiológico e as alterações da dentina com a utilização da microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Na análise microbiológica ao comparar-se as amostras controle às experimentais, observou-se redução no número de bactérias. O selamento proporcionou uma redução numérica da população bacteriana com variável intensidade, sendo que a maior inibição ocorreu sobre *S. mutans*.

Embora os lactobacilos sejam considerados os microrganismos predominantes em lesões de cárie profunda (Kidd et al. 1993; Bjordal et al. 1997; Maltz et al. 2002), no estudo de Duque (2006), detectou-se a prevalência de estreptococos do grupo *mutans* sobre os lactobacilos, cujo achado acorda com outros recentes estudos (Ayna et al. 2003).

Na literatura existe uma carência de estudos que objetivam localizar os microrganismos posteriormente à remoção da lesão cariosa. Ozaki et al. 1994 avaliaram a prevalência e localização de bactérias específicas, incluindo microrganismos cariogênicos e alguns anaeróbicos obrigatórios, em cárie de fissura, superfície lisa coronal e radicular por meio da contagem de túbulos dentinários infectados identificados imunohistoquimicamente em cortes de dentina cariada.

Na observação morfológica da penetração bacteriana, os microrganismos seguiram a curvatura dos túbulos dentinários, como um cone nos cortes de cárie de fossa e fissura, e estendendo-se em forma de S nos cortes da cárie interproximal e radicular. Na zona superficial de penetração os microrganismos seguiram os túbulos dentinários em direção à cavidade pulpar e se espalharam lateralmente na dentina intertubular. Na zona profunda de penetração bacteriana alguns microrganismos espalharam-se apenas junto aos túbulos dentinários.

Berkiten et al. (2000) investigaram a penetração de *Streptococcus sanguis* e *Prevotella intermedia* nos túbulos dentinários humanos das superfícies pulpares à dentina externa pelo uso de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia de luz.

O *S. sanguis* penetrou nos túbulos dentinários proximamente à superfície do cimento e a profundidade variou entre 50 a 880 μm , em um valor médio de 382,3 μm . A profundidade de penetração da *P. intermedia* variou entre 0.1 e 275 μm com valor médio de 25.9 μm .

Perez et al. (1998) sugeriram em razão do tamanho da *P. intermédia* (0.7 a 2) e diâmetro do túbulo que a profundidade de penetração deveria ser maior, porém consideraram que as fibrilas existentes na parede celular desta bactéria e a sua tendência em formar colônias constituíram-se em uma barreira física à penetração desta no túbulo dentinário.

Somado às barreiras físicas inerentes à bactéria Berkiten et al. (2000) propuseram que os prolongamentos odontoblásticos também seriam fator de impedimento à penetração das bactérias nos túbulos dentinários. Entretanto em suas análises ao MEV não detectaram nenhuma extensão do processo odontoblástico como barreira física e acrescido a este fato qualquer estrutura física que impedisse a penetração de bactérias seria efetiva também com *S. sanguis*.

Jeronimus et al. (1975) realizaram um estudo em molares permanentes com aplicação de selante em cárie incipiente, moderada e profunda. Observaram a ocorrência de microrganismos viáveis na cárie média e profunda selada. A presença destes na junção amelo-dentinária e nas camadas profundas, poderiam sugerir uma habilidade na obtenção de nutrientes via túbulos dentinários e alguns dos microrganismos presentes nas camadas profundas de dentina não seriam afetados ao ficarem isolados do meio bucal. Independentemente do tipo de selante utilizado permaneceram vivos e possivelmente com potencial para continuar o processo cariioso.

Handelman et al. (1976), verificaram após dois anos de selamento dentário a redução na contagem total de microrganismos viáveis na dentina contaminada e que a mesma aumentou com o tempo. A redução na contagem de bactérias viáveis ocorreu de modo mais expressivo nas primeiras duas semanas. Este resultado está de acordo com outros estudos (Falster et al. 2002; Maltz et al. 2002) e os autores relataram que embora ocorressem em algumas lesões a persistência de bactérias seu número se expressava extremamente reduzido e as mesmas não pareciam capazes de continuar o processo cariioso provavelmente devido ao inadequado suprimento de nutrientes.

2.4. Análise dos agentes histológicos desmineralizantes e sua influência na coloração da bactéria

As bactérias ou suas toxinas podem ter um importante papel no início e na manutenção de uma reação inflamatória na polpa dentária.

A detecção das bactérias nas paredes e no assoalho da cavidade pulpar pode ser determinada de duas maneiras: pelo método bacteriológico e pela análise de cortes histológicos corados pelo método de Gram modificado por Brown e Brenn (Brown-Brenn, 1931; Luna, 1960).

Nos cortes histológicos são observadas bactérias coradas em azul, as Gram-positivas e em vermelho, as Gram-negativas de difícil distinção dos componentes teciduais.

Este método da coloração supracitado inviabiliza aferições a respeito da viabilidade e patogenicidade (Mjör, 1974). Contudo, exames histológicos de cortes descalcificados são satisfatórios quanto à presença ou ausência de microrganismos na parede pulpar (Browne et al. 1983). Ainda, técnicas histológicas apresentam eficácia na detecção de bactérias devido à facilidade da mesma (Qvist & Qvist, 1980).

O efeito cumulativo da desinfecção, armazenamento, fixação histológica e desmineralização sobre o número e a capacidade de coloração de bactérias Gram – positivas tem sido alvo de estudos e análises quanto aos resultados obtidos mediante o processamento utilizado (Wijnbergen & Van Muller, 1991).

Após a fixação, o primeiro passo no processamento histológico antes do mergulho em parafina, é a desmineralização, realizada com ácido fórmico, ácido nítrico, EDTA e outros. Pesquisas demonstraram que o ácido fórmico e o EDTA promoveram redução severa do número e da capacidade de coloração das Gram-positivas. Wijnbergen & Van Muller 1991, verificaram que ao utilizarem o EDTA ou ácido nítrico em substituição ao ácido fórmico, observaram uma bactéria corada para cada três, ao invés de uma, para cada quinze respectivamente em relação à Gram-positiva.

Apenas as bactérias coradas de azul podem ser claramente detectadas nos cortes teciduais. Assim, os resultados dos experimentos, indicam que com um número limitado de organismos, existe o risco de escores falso-negativos para cortes de tecidos duros descalcificados (Wijnbergen & Van Muller, 1987).

Ozaki et al. (1994) em seu estudo utilizaram para processamento histológico ácido fórmico de sódio 10,0% por 4 dias a 4°C, para descalcificação. Dez cortes seriados de 6µm espessura foram obtidos a partir das metades de todos os dentes, e estes foram submetidos ao método de Brown e Brenn e ao método imunohistoquímico, usando biotina com estreptavidina (LSBA) a temperatura ambiente. Os autores ressaltaram que a antigenicidade das bactérias pudesse desaparecer durante o processo de descalcificação. Contudo, o estudo mostrou que os microrganismos após imersão em solução descalcificante ainda eram

capazes de reagir com seu anti-soro correspondente. As bactérias coradas de Gram-positivo podem aparecer como Gram - negativas e outras reações de falso-negativo nos cortes podem ocorrer ocasionalmente devido a procedimentos de descalcificação.

3. PROPOSIÇÃO

Análise histobacteriológica, qualitativa da dentina remanescente de pré-molares humanos após a remoção do tecido cariado.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Para o presente estudo, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia – UFU (Anexo1), foram selecionadas lâminas histológicas representativas de cortes histológicos seriados de 20 dentes, obtidos durante a pesquisa de Biffi et al. (1982). Estes cortes representavam a porção mais profunda da cárie em pré-molares superiores humanos permanentes, extraídos de pacientes de ambos os gêneros e faixa etária de 20 a 40 anos. O critério de inclusão dos dentes no estudo foi que os mesmos deveriam apresentar cárie proximal e/ou oclusal e que a remoção do tecido cariado tenha sido realizada *in vitro*. Após exodontia os dentes foram mantidos em formol a 10,0% tamponado em pH=7,0.

4.1. Remoção do tecido cariado e documentação macroscópica

Antes da remoção do tecido cariado foram feitas fotografias das lesões e radiografias *in vitro* simulando o método interproximal. Para tal colocou-se o filme e o dente em uma superfície plana de tal modo que o feixe central de raios-X incidisse perpendicularmente ao longo eixo do dente, com o intuito de evitar distorções na imagem.

Todos os dentes foram classificados de acordo com a profundidade de cárie, segundo critérios definidos por Biffi et al. (1982), em:

Grau 0 – ausência de cárie;

Grau 1 – cárie de esmalte;

Grau 2 – cárie rasa com 1/3 de dentina comprometida;

Grau 3 – cárie média com até 2/3 de dentina comprometida;

Grau 4 – cárie profunda com até 3/3 de dentina comprometida, sem exposição pulpar;

Grau 5 – exposição pulpar.

A remoção do tecido cariado foi realizada por um único operador. Os dentes foram manualmente seguros com as raízes protegidas por gaze. Foi utilizada inicialmente colher de dentina seguida por brocas esféricas de aço, em baixa rotação, de números 2, 3 ou 4, dependendo da extensão da cárie. Durante todo o procedimento clínico de remoção, a cavidade era irrigada com soro fisiológico. Quando a sonda exploradora, pressionada no assoalho da cavidade, não se prendia mais na dentina considerava-se concluída a remoção do tecido dentinário.

Após constatação clínica da remoção do tecido cariado, seccionou-se longitudinalmente o dente no sentido mesio-distal, com disco de diamante sob jato de água, tendo-se o cuidado de atingir a cárie e a polpa em um único corte, de maneira a obter-se duas metades. Os dentes hemi-seccionados foram fotografados e reavaliados, levando-se em consideração a cárie de esmalte (Fig. 1 B, caso 1).

4.2. Processamento histológico

Os dentes mantidos em recipiente contendo formol a 10,0% tamponado (pH=7,0) durante 24 a 48 horas, foram desmineralizados em solução citratada de ácido fórmico a 25,0% (Rodrigues & Langeland, 1976) sob agitação constante (Rodrigues & Horta, 1977) durante 15 a 20 dias, desidratados em quatro banhos de álcool etílico por quatro horas, diafanizados em três banhos de benzol por duas horas e incluídos em parafina a 56° C por cinco horas.

Cortes seriados de 5µm de espessura foram obtidos utilizando micrótomo (Leica—RM2155). Procurou-se obter cortes longitudinais seriados, das duas metades em separado (seção vestibular e lingual) a partir do corte central da polpa dentária.

Para a montagem das lâminas utilizou-se PERMOUNT[□] e lamínulas 24x60.

As lâminas foram coradas no Laboratório de Histologia da Área de Ciências Morfológicas da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade Federal de São Paulo, pelas técnicas de coloração para Hematoxilina e Eosina – HE (Anexo 2), Tricrômico de Masson (Anexo 3) e histobacteriológico de Gram, método modificado por Brown e Brenn (Anexo 4, LUNA, 1960).

4.3. Análise microscópica das amostras

Os cortes histológicos foram analisados ao microscópio (AXIOSTAR PLUS-CARL ZEISS) e as fotomicrografias obtidas no fotomicroscópio (REICHERT-JUNG).

Os cortes corados em HE possibilitaram o estudo das alterações morfológicas e processo inflamatório relacionado ao tecido pulpar dos dentes cariados. O Tricromico de Masson permitiu a visualização de fibras intercelulares, fibras colagêneas e muco. Para identificação de colônias de microrganismos foram utilizados os cortes corados pelo histobacteriológico de Gram.

Para a avaliação histológica escolheu-se preferencialmente a lâmina que continha o corte em que a cavidade de cárie mais se aproximava da polpa, ou seja, existia uma menor espessura de dentina separando o assoalho da cavidade produzida pela cárie.

As três faces do dente (mesial, oclusal e distal) foram clinicamente classificadas quanto à profundidade da cárie em graus 0,1, 2, 3, 4 ou 5 e microscopicamente avaliadas.

Das 60 faces avaliadas, segundo o diagnóstico clínico de cárie e visualização microscópica, foi determinada a presença ou ausência de microrganismos alojados nos túbulos dentinários, a forma de penetração dos mesmos (superficial ou profunda) e a localização de nichos bacterianos utilizando objetivas de 10, 40 e 100X.

4.4. Análise estatística

O coeficiente de correlação de Pearson ($-1 \leq r \leq +1$) foi utilizado nas variáveis qualitativas (presença do microrganismo, graus de cárie e localização na junção amelo-dentinária e assoalho pulpar) a fim de averiguar uma possível correlação.

5. RESULTADOS

De modo geral, observou-se nas lâminas selecionadas a presença de bactérias dispostas em um padrão de invasão característico, ou seja, uma penetração de forma superficial ou/e profunda, tanto no assoalho quanto na junção amelo-dentinária (Tabela 1).

Quanto à localização notou-se a presença de nichos bacterianos no preparo cavitário na junção amelo-dentinária e no assoalho pulpar. Também foi possível verificar que apesar de existir bactérias alojadas nos túbulos dentinários estes apresentavam organização tubular preservada.

Das 60 faces analisadas 37 foram diagnosticadas clinicamente como cariadas, sendo 10 cárie grau 1, 10 grau 2, 8 grau 3, 5 grau 4 e 4 grau 5. Ao correlacionar a presença do microrganismo no túbulo dentinário segundo o diagnóstico clínico da cárie dos 20 dentes avaliados, 02 apresentaram cárie classificada clinicamente como oclusal e ao exame microscópico ambos apresentaram microrganismo em pelo menos uma das faces analisadas após o preparo cavitário. Entretanto, dos 18 dentes com cárie proximal, apenas 14 apresentaram microrganismos nos túbulos dentinários (Quadro 1).

Das 10 cárie de grau 1, em apenas uma foi detectada a presença de microrganismos (Figura 1). Nos casos 5, 8 e 10, mesmo apresentando perda de conteúdo dentinário, não foi detectada dentina contaminada. No restante da amostragem, observou-se em pelo menos uma das faces cariadas por dente, a presença de microrganismos no interior do túbulo dentinário (Quadro 2).

RESULTADOS

Tabela 1. Número de dentes estudados (caso), profundidade da cárie*, microrganismos detectados nos túbulos dentinários do dente examinado e observações quanto à profundidade e à localização dos microrganismos no preparo cavitário.

Caso	Profundidade da cárie* (faces)			Microrganismos detectados (faces)			Observações
	M	O	D	M	O	D	
01	0	1	0		x		Penetração superficial na junção amelo-dentinária (fig.1).
02	2	0	1	x			(M) Penetração profunda no assoalho e na junção amelo-dentinária. (D) Não detectado (fig.2).
03	2	0	1	x			(M) Penetração superficial no assoalho e na junção amelo-dentinária. (D) Não detectado.
04	1	0	4			x	(M) Não detectado. (D) Penetração superficial no assoalho.
05	2	0	0				Não foi detectado microrganismo.
06	4	0	3	x		x	(M e D) Penetração superficial no assoalho e na junção amelo-dentinária.
07	3	0	3	x			(M) Penetração superficial no assoalho e na junção amelo-dentinária. (D) Não detectado.
08	3	0	0				Não foi detectado microrganismo
09	3	0	2	x			(M) Penetração superficial no assoalho. (D) Não detectado.
10	2	0	0				Não foi detectado microrganismo.
11	3	0	1	x			(M) Penetração profunda no assoalho e na junção amelo-dentinária. (D) Não detectado (fig.3).
12	2	3	1	x	x		(M) Penetração profunda no assoalho e na junção amelo-dentinária. (O) penetração superficial abaixo da restauração. (D) Não detectado (fig.4).
13	3	0	2	x			(M) Penetração superficial no assoalho e na junção amelo-dentinária. (D) Não detectado.
14	1	0	1				Não foi detectado microrganismo.
15	1	0	1	x			(M) Penetração na junção amelo-dentinária. (D) Não detectado.
16	5	0	2			x	(M) Não detectado. (D) Penetração superficial no assoalho e na junção amelo-dentinária (fig. 5).
17	4	0	4	x		x	(M e D) Penetração nos bordos amelo-dentinário
18	5	0	4	x		x	(M) Penetração superficial no assoalho e nas paredes da câmara pulpar. (D) Penetração superficial no assoalho.
19	2		5	x		x	(M e D) Penetração superficial no assoalho e na junção amelo-dentinária (fig. 6).
20	2	0	5			x	(M) Não detectado. (D) Penetração profunda no assoalho e na junção amelo-dentinária.

* 0 ausência de cárie, 1 cárie de esmalte, 2 cárie rasa com 1/3 de dentina comprometida, 3 cárie média com 2/3 de dentina comprometida, 4 cárie profunda com 3/3 de dentina comprometida sem exposição pulpar e 5 exposição pulpar.

RESULTADOS

Quadro 1: Presença do microrganismo no túbulo dentinário, visualização microscópica, segundo diagnóstico clínico da cárie.

CÁRIE		PRESENÇA DO MICRORGANISMO NO TÚBULO DENTINÁRIO	
Classificação Clínica	Quantidade	SIM	NÃO
Oclusal	2	2	-----
Proximal	18	14	4

RESULTADOS

Quadro 2: Presença e distribuição do microrganismo nas faces cariadas, avaliação microscópica, segundo classificação e localização clínica da profundidade de cárie nas 37 faces diagnosticadas clinicamente como cariadas.

Grau de Cárie (37 faces)			Microrganismo				
M	O	D	Não Detectado	Detectado no Assoalho (Profundo)	Detectado no Assoalho (Superficial)	Detectado na Junção Amelo-dentinária (Profundo)	Detectado na Junção Amelo-dentinária (Superficial)
	1						+
2				+		+	
		1	+				
2					+		+
		1	+				
1			+				
		4		+			
2			+				
4					+		+
		3			+		+
3					+		+
		3	+				
3			+				
3					+		
		2	+				
2			+				
3				+		+	
		1	+				
2				+		+	
	3				+		
		1	+				
3					+		+
		2	+				
1			+				
		1	+				
1							+
		1	+				
5			+				
		2			+		+
4						+	
		4				+	
5					+		
		4			+		
2					+		+
		5			+		+
2			+				
		5		+		+	

Ao correlacionar o número de microrganismos encontrados nos diferentes graus de cárie pôde-se verificar a existência de uma correlação fracamente positiva (0,038) cujo resultado estatístico confirma que a localização e a distribuição dos microrganismos nos túbulos dentinários foi variada e independente da profundidade da cárie (Gráfico 1).

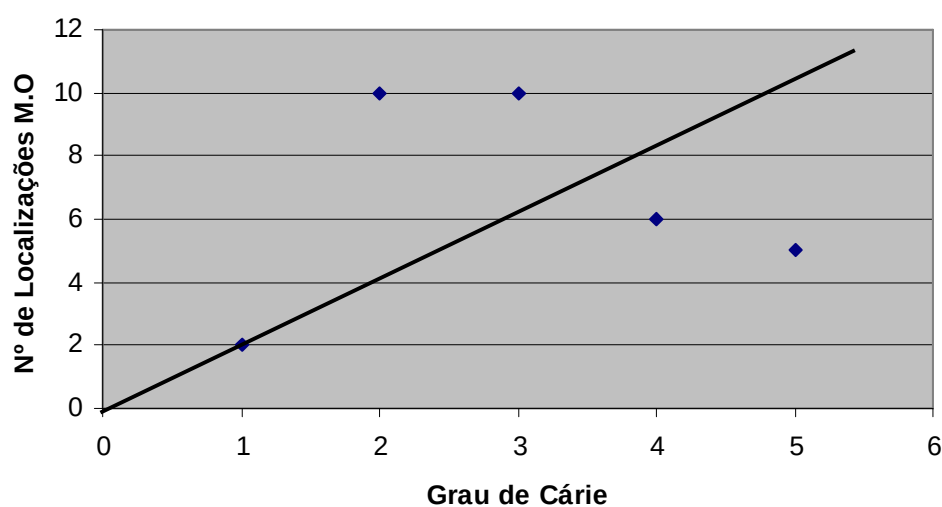


Gráfico 1: Correlação entre o grau de cárie e a quantidade de localizações de microrganismos (M. O) nas faces estudadas.

Ao correlacionar a localização dos microrganismos encontrados nos diferentes graus de cárie com a forma de distribuição (superficial ou profunda) e a localização (junção amelo-dentinária e assoalho pulpar) pôde-se verificar a nulidade de correlação demonstrando que a localização e a distribuição dos microrganismos nas áreas consideradas no estudo como críticas não se relacionaram à profundidade da cárie (Gráfico 2).

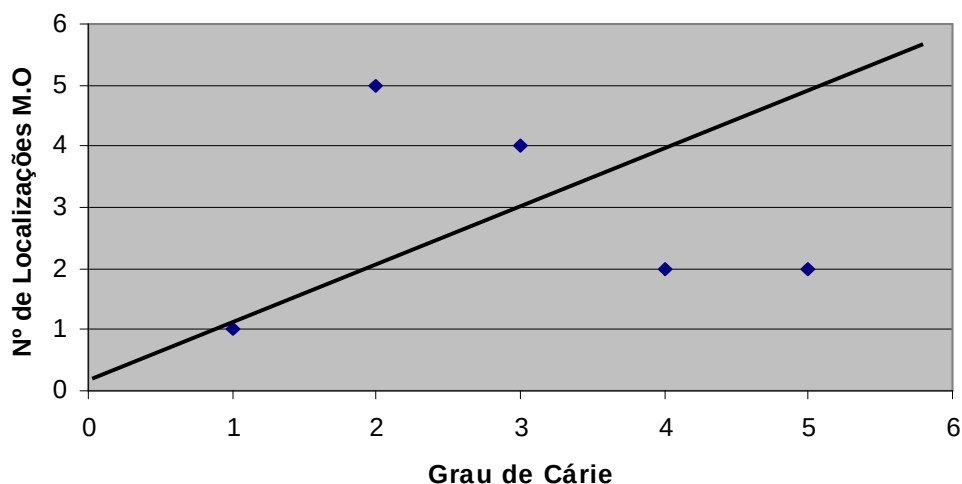
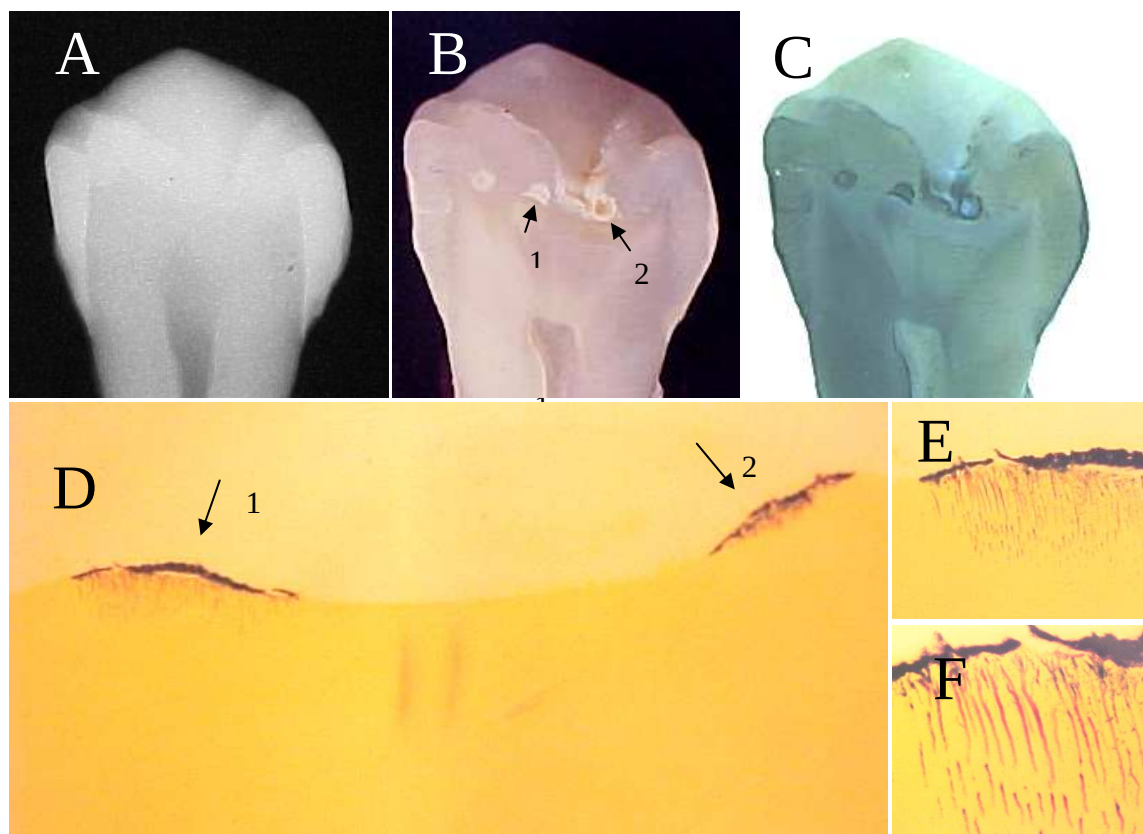


Gráfico 2: Correlação entre o grau de cárie e o número de localizações de microrganismos na junção amelo-dentinária, penetração superficial, e assoalho pulpar, penetração profunda.

Figura 1: Caso 1



A – radiografia, hipótese de diagnóstico - ausência de cárie oclusal;

B – corte longitudinal a partir da porção central da polpa dentária. Hemi-seção do dente: evidencia de cárie de esmalte;

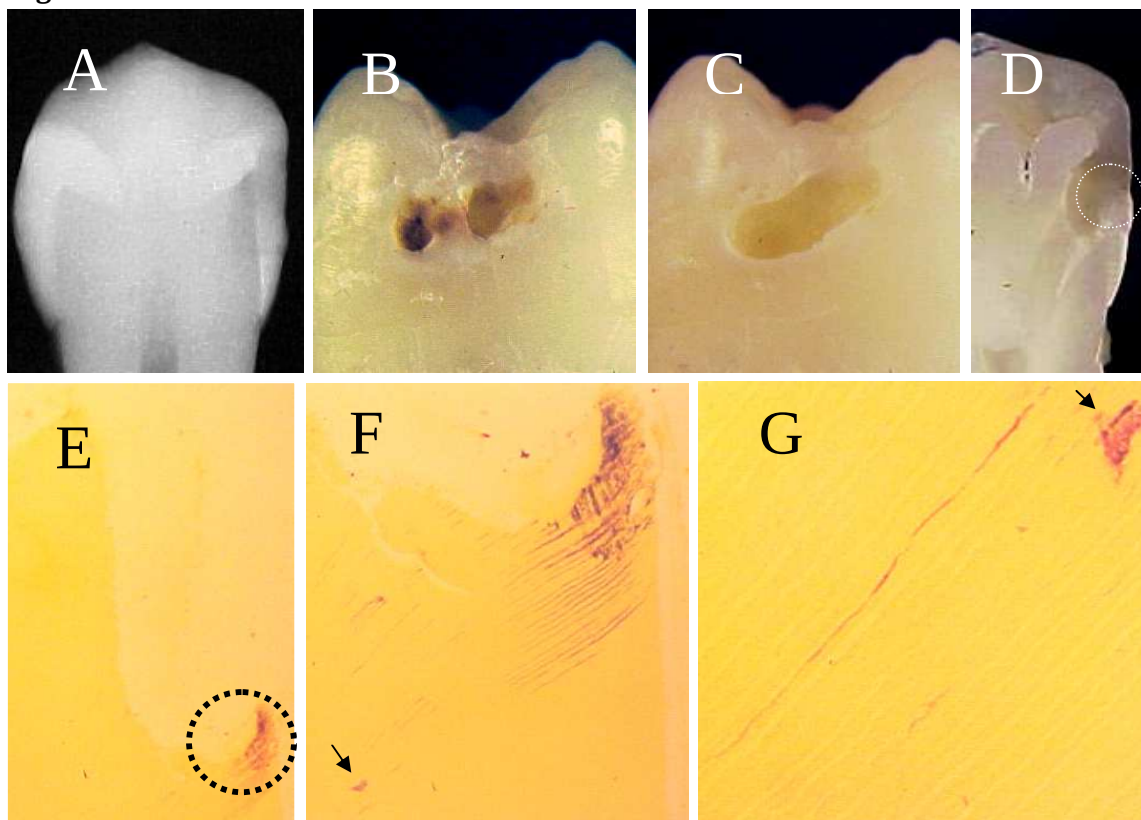
C – negativo da hemi-seção, confirmação de cárie ao nível de esmalte;

D – coloração de Gram, presença de microrganismos na dentina, regiões subjacentes à cárie de esmalte; (Brown e Brenn; ampliação original: 10X).

E - presença de microrganismos nos túbulos dentinários após a remoção da cárie de esmalte; (Brown e Brenn; ampliação original: 100X).

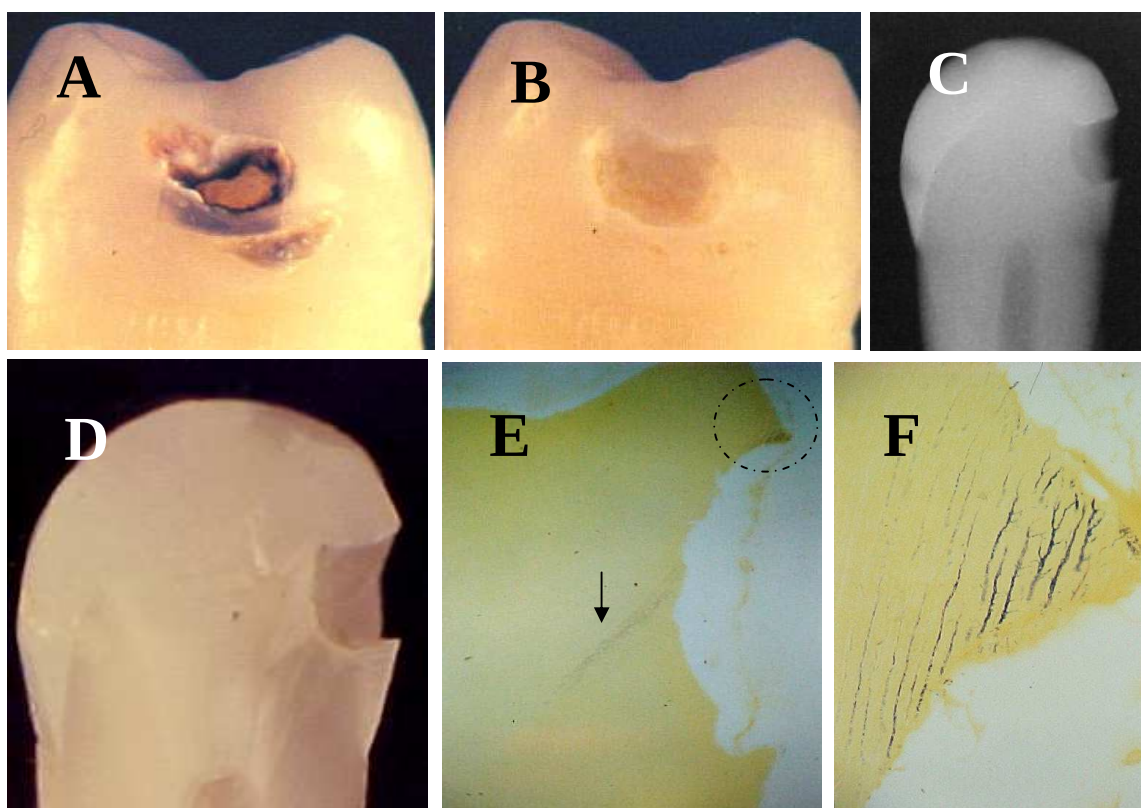
F – distribuição dos microrganismos, de forma superficial. (Brown e Brenn; ampliação original: 100X).

Figura 2: Caso 2



A – radiografia, hipótese de diagnóstico de cárie proximal de profundidade média;
 B – fotografia da face cariada;
 C – fotografia da face proximal após a remoção clínica do tecido cariado;
 D – corte longitudinal a partir da porção central da polpa dentária. Hemi-secção do dente: evidencia do bordo inferior ao nível da junção amelo-dentinária (círculo);
 E – coloração de Gram, presença de microrganismos na dentina (círculo). (Brown e Brenn; ampliação original: 10X);
 F – presença de microrganismos, penetração profunda nos túbulos dentinários após a remoção da cárie; (Brown e Brenn; ampliação original: 10X);
 G – presença de microrganismos, penetração profunda (seta) maior aumento de F; (Brown e Brenn; ampliação original: 40X).

Figura 3: Caso 11



A – fotografia da face mesial cariada;

B – fotografia da face mesial após a remoção clínica do tecido cariado;

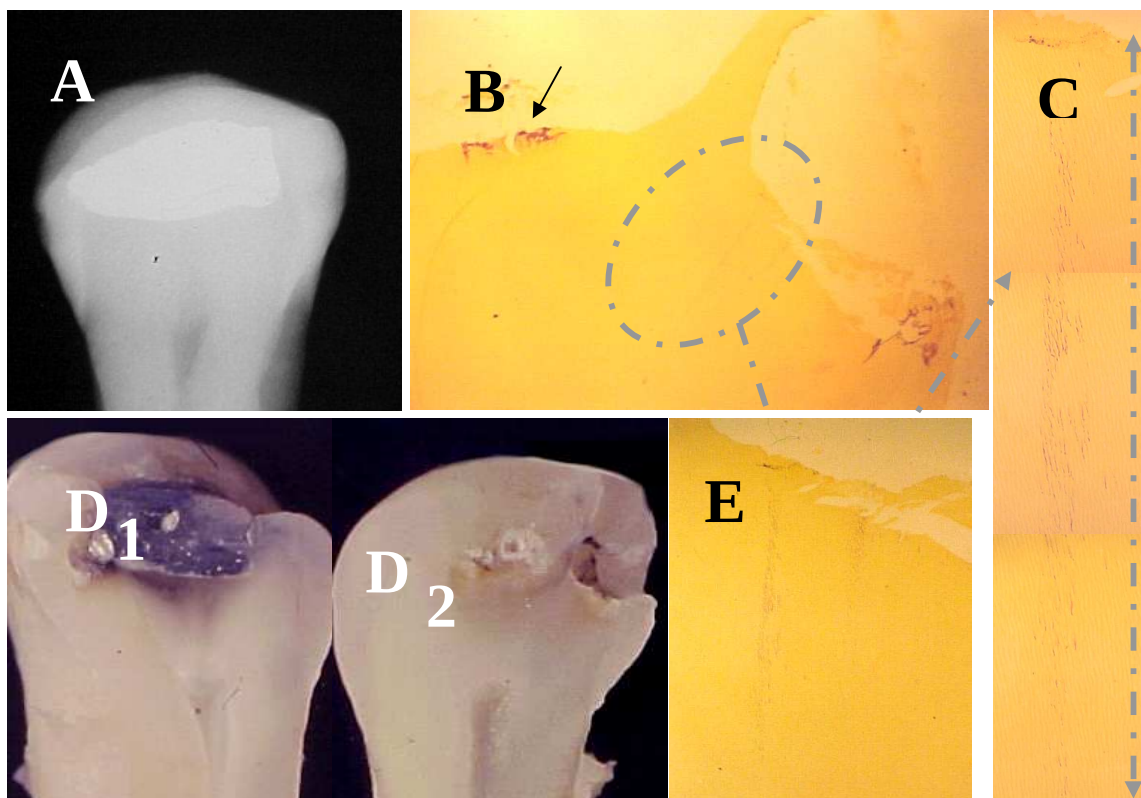
C – radiografia, hipótese de diagnóstico de cárie proximal de profundidade média;

D – corte longitudinal a partir da porção central da polpa dentária. Hemi-secção do dente: após a remoção clínica da cárie;

E – coloração de Gram, presença de microrganismos do bordo superior ao nível da junção amelo-dentinária (círculo); Frente de penetração dos microrganismos (seta). (Brown e Brenn; ampliação original: 10X);

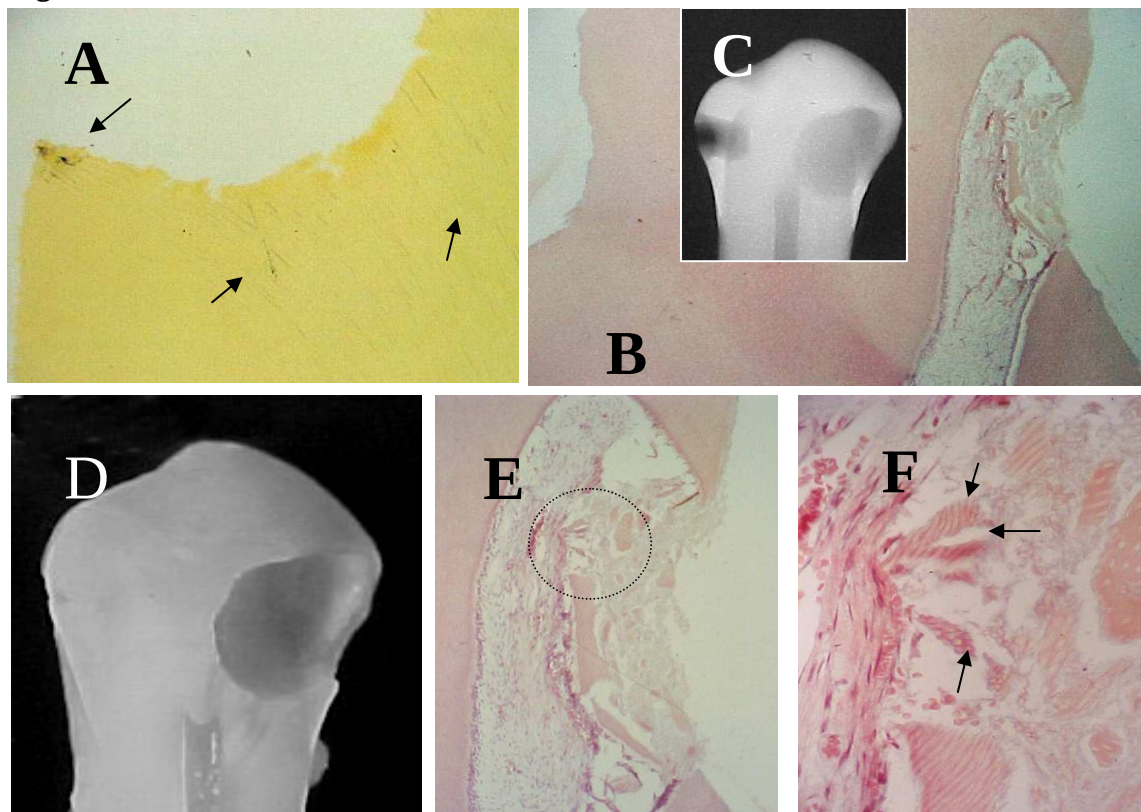
F - presença de microrganismos nos túbulos dentinários, maior aumento de E (círculo) após a remoção da cárie; (Brown e Brenn; ampliação original: 40X).

Figura 4: Caso 12



- A – radiografia, hipótese de diagnóstico de cárie proximal e restauração de amálgama (radiopaca);
- B – coloração de Gram, presença de microrganismos na face mesial e oclusal subjacente à restauração de amálgama. (Brown e Brenn; ampliação original: 10X)
- C – Fotomontagem: penetração profunda (em forma de cone) de microrganismos nos túbulos dentinários após a remoção da cárie; (Brown e Brenn; ampliação original: 40X).
- D – corte longitudinal a partir da porção central da polpa dentária (sentido mesio-distal). Secção vestibular (D1) e secção lingual (D2);
- D1 restauração de amálgama onde em B (seta) visualiza-se dentina contaminada subjacente a restauração; D2 cavidade onde mesmo após a remoção do tecido cariado permanece dentina contaminada, observar em B (círculo), em E e C (seta);
- E – Maior aumento de B (círculo). (Brown e Brenn; ampliação original: 10X).

Figura 5: Caso 16



A – coloração de Gram, presença de microrganismos do bordo inferior da cavidade na junção amelo-dentinária (círculo); presença de microrganismos distribuídos homogeneamente (setas). (Brown e Brenn; ampliação original: 10X);

B – presença de cárie proximal e mesial com exposição pulpar.(Tricrômico de Masson. ampliação original: 10X);

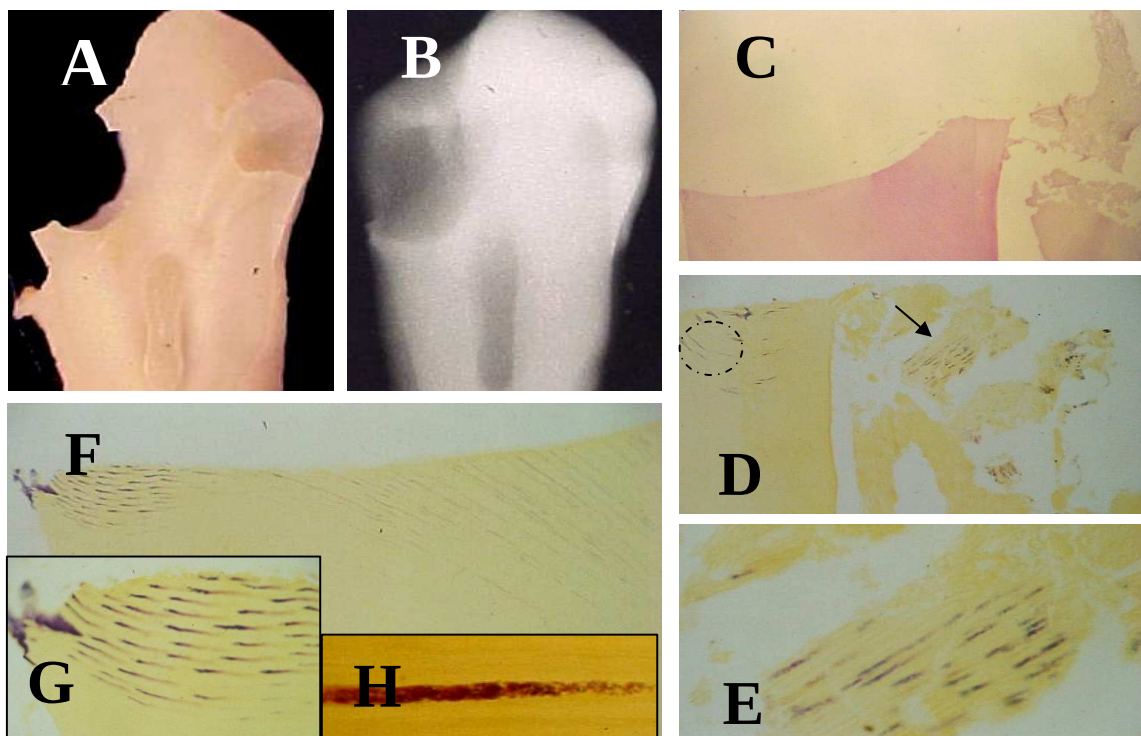
C – imagem radiográfica de cárie proximal;

D – corte longitudinal a partir da porção central da polpa dentária. Hemi-secção do dente após a remoção da cárie;

E - Maior aumento de B evidenciando exposição pulpar patológica (ampliação original: 4X).

F - presença de fragmentos de dentina introduzidos no tecido pulpar durante remoção do tecido cariado; (H.E. ampliação original: 40X).

Figura 6: Caso 19



A – hemi-seção do dente, presença de cárie distal com exposição pulpar e cárie mesial de profundidade média;

B – imagem radiográfica cuja hipótese de diagnóstico de cárie profunda mesial e distal;

C – exposição pulpar pela cárie. (Tricromo de Masson. ampliação original 10X);

D – maior aumento de C, evidência de microrganismos remanescentes na dentina; presença de fragmentos de dentina (seta) contaminada introduzida durante a remoção do tecido cariado; (Brown e Brenn. ampliação original 10X);

E – fragmento de dentina, levado durante a remoção clínica da cárie, no interior da câmara pulpar, maior aumento de D (seta); (Brown e Breen. ampliação original 40X);

F - assoalho da cavidade após a remoção do tecido cariado com contaminação generalizada dos túbulos dentinários; (Brown e Breen. ampliação original 10X);

G – evidência do bordo inferior da cavidade, nível da junção amelo-dentinária, presença de microrganismos localizados de forma superficial difusa; (ampliação original 40X);

H – presença de microrganismos situados nos túbulos morfológicamente inalterados (círculo em D); (Brown e Breen. ampliação original 100X).

6. DISCUSSÃO

Embora muitos estudos já tenham sido realizados para elucidar a presença e distribuição dos microrganismos no tecido dentinário após a remoção clínica da cárie, seu conhecimento e diagnóstico ainda é um desafio freqüente na clínica odontológica.

Para a realização desta pesquisa, a amostra, advinda da pesquisa realizada por Biffi et al. (1982), consistiu de 20 dentes pré-molares superiores humanos, com cárie oclusal e/ou proximal, apresentados em lâminas histológicas contendo cortes histológicos seriados, que foram submetidos às colorações de Hematoxilina e Eosina, Tricrômico de Masson e Gram.

Ao utilizar esta amostra teve-se a intenção de verificar a presença, distribuição e localização dos microrganismos após a remoção do tecido cariado, objetivo até então inexplorado e acrescido de informações da literatura atual.

Assim, ao se iniciar a pesquisa, tomou-se como desnecessário, antiético e improdutivo, incluir uma etapa metodológica de obtenção de dentes no tempo presente. A amostra pré-estabelecida em 1982 apresentava-se preservada, inexplorada e em condições de sofrer as colorações pré-determinadas durante o processamento laboratorial com presença mínima de artefatos de técnica, sobretudo capaz de cumprir satisfatoriamente a proposta do estudo.

O tecido pulpar apresenta-se protegido de agressões externas pelo seu isolamento anatômico (Bammann & Estrela, 1991) conferido pela dentina constituída de túbulos que se estendem a partir do esmalte à polpa e que possuem características específicas variáveis conforme a área analisada.

O diâmetro tubular próximo da polpa é aproximadamente de $3\mu\text{m}$, com uma extensão de $45.000\text{ túbulos/mm}^2$, enquanto que próximo à junção amelo-dentinária aproxima-se de $1\mu\text{m}$ com $19.000\text{ túbulos/mm}^2$, características que interferem durante a análise sobre a ação bacteriana e de materiais restauradores na dentina e tecido pulpar (Garberoglio et al.1976; Carrigan et al. 1984).

A penetração superficial do microrganismo na junção amelo-dentinária poderia sugerir uma habilidade na obtenção de nutrientes via túbulos dentinários associada à possibilidade de microinfiltração na restauração. Ainda, microrganismos localizados nas camadas profundas do assoalho pulpar não são afetados ao serem isolados do meio bucal, independentemente do tipo de selante utilizado, permanecerão vivos e possivelmente com potencial para continuar o processo cariioso (Jeronimus et al. 1975).

A partir da análise da literatura sobre a permeabilidade tubular, presença e localização do microrganismo, diâmetro e densidade do túbulo dentinário, considerou-se como área crítica o assoalho pulpar e a junção amelo-dentinária, cujas penetrações bacterianas foram respectivamente profunda e superficial.

Justifica-se a escolha das referidas áreas consideradas como críticas pela facilidade de difusão de resíduos metabólicos, enzimas, toxinas bacterianas e componentes tóxicos dos materiais restauradores (Bergenholtz, 1981; Dahlén, 2000) e pela possibilidade de obter nutrientes por meio da interface dente-restauração que podem dar continuidade ao processo cariioso.

Por avaliação microscópica detectou-se microrganismo na junção amelo-dentinária com penetração tanto superficial como profunda, bem como esmalte sem apoio, com função de nicho bacteriano, que podem comprometer a restauração por interferirem no vedamento marginal. As figuras 2, 3 e 4 demonstram microrganismos na junção amelo-dentinária.

Kronfeld (1955) e Shovelton (1970), informam que sob restaurações clinicamente satisfatórias os microrganismos desaparecem gradualmente. Entretanto, se ocorrer infiltração, Langeland (1976) afirma que esses microrganismos latentes, em condições propícias, podem proliferar quando exibirem membrana plasmática íntegra.

Não há dúvida sobre a presença de microrganismos nos túbulos dentinários durante o avanço das cáries. Apesar de existir controvérsia referente à viabilidade dos mesmos em relação a desmineralização da dentina, à localização da bactéria e à resposta pulpar (Lui, 1990).

O presente estudo ilustra, na figura 4 (caso 12) microrganismos na face oclusal subjacente à restauração de amálgama. Entretanto, não é possível afirmar que os mesmos advêm da interface dente-restauração, ou se já estavam alojados superficialmente nos túbulos dentinários quando da perda do esmalte. Contudo, afigura-se com especial importância a persistência dos microrganismos nos túbulos dentinários, mesmo após a remoção do tecido cariado e a presença de restauração.

O método de Brown e Brenn foi aplicado para elucidar a presença de bactérias no tecido dentinário dos dentes analisados. A literatura afirma que este método pode se tornar limitado se não forem realizados e analisados todos os cortes da amostra, pois a invasão dos microrganismos pode ser irregular e os mesmos estarem presentes nos túbulos dentinários, e não serem evidenciados em todos os cortes (Watts, 1987).

Dos 20 dentes avaliados, 60 faces foram analisadas das quais 23 classificadas clinicamente como não cariadas e por avaliação microscópica não evidenciaram microrganismos e perda de conteúdo dentinário com todos os cortes avaliados, explicitando uma efetiva correspondência dos diagnósticos clínico e histológico.

Das 37 faces diagnosticadas clinicamente como portadoras da lesão cariada, 21 (56,75%) continham histologicamente microrganismos. Durante a análise microscópica percebeu-se que as bactérias persistiam nos túbulos dentinários e nem sempre quando a cárie era classificada clinicamente como rasa havia correspondência na localização dos microrganismos, constatação estendida aos outros graus de cárie.

Tal afirmação confirma-se na Tabela 1- caso 2, classificado clinicamente como cárie rasa, com um terço de dentina comprometida, em que foram observadas bactérias instaladas profundamente nos túbulos dentinários (Figura 2).

Outra evidência percebida foi que a remoção da cárie, baseada em critérios clínicos, tais como dureza e coloração da dentina não garante a higidez pulpar e a eliminação total de microrganismos, visto que a dentina permanece contaminada. Esta comprovação vai de encontro a investigações que relacionam o aspecto escurecido ou a dureza da dentina à

existência de bactérias, mesmo que em menor proporção (Bjorndal et al. 1997;2000; Ozaki et al. 1994).

A avaliação dos aspectos clínicos da dentina pode variar de acordo com os critérios táteis e visuais inerentes a cada investigador que é normalmente guiado por suas próprias respostas sensoriais e experiência clínica, o que motiva especulações referentes à persistência e localização quantitativamente variadas de microrganismos nos túbulos dentinários.

Bonecker et al. (2003) ratifica que pode não existir correlação entre o aspecto clínico e a redução da microbiota. E ainda, Biffi et al. (1982), observaram que os microrganismos situados profundamente na dentina clinicamente sadia e perceptíveis apenas em exames laboratoriais, poderiam dificultar o diagnóstico clínico da real profundidade da cárie. Tais afirmações acordam com os resultados representados na figura 1 (caso 1), em que, embora clinicamente a cárie tenha sido diagnosticada como de esmalte, observou-se em âmbito de microscopia a presença de comprometimento dentinário pelos microrganismos instalados superficialmente nos túbulos.

Outra questão merecedora de discussão consiste na remoção do tecido cariado e conseqüente exposição pulpar, manobra clínica realizada com frequência, em que muitas vezes pode-se obter sucesso clínico, com preservação da polpa. Entretanto, até que ponto considerar a recuperação pulpar frente a uma exposição por cárie? Na Figura 6 (caso 19), fica evidente a presença de fragmentos dentinários contaminados no tecido pulpar que foram introduzidos inadvertidamente pelo profissional no momento da remoção do tecido cariado.

Ainda, na figura 6 (caso 19), observou-se à presença do microrganismo situado profundamente no túbulo dentinário morfológicamente inalterado. Mediante a análise clínica pelo profissional, deparar-se-ia com a dubiedade de um tecido com dureza clinicamente semelhante a uma dentina sadia, porém contaminado.

Na figura 5 (caso 16), verifica-se em um mesmo corte histológico exposição pulpar patológica e cárie de grau 2 na face distal. Durante a análise microscópica o fragmento dentinário introduzido na câmara pulpar quando da remoção do tecido cariado apresentou ausência de microrganismo. Entretanto, na face distal do mesmo corte sobre a avaliação da mesma coloração observou-se bactéria em toda a extensão do assoalho pulpar. Esta resposta diversificada frente ao processo carioso e o complexo dentina-polpa têm sido alvo de investigações ainda não esclarecidas. A dinâmica existente entre o microrganismo, virulência e resposta orgânica, incentiva o desenvolvimento de pesquisas que busquem explicações da relação entre microbiologia e patologia (Estrela, 1997).

A não detecção de bactérias em 16 faces analisadas 43,25% (Tabela 1) clinicamente classificadas como cariadas e com evidência microscópica de perda do conteúdo dentinário, não assegura a esterilidade dos cortes avaliados e nem a acurácia na remoção clínica da cárie.

No processamento laboratorial do dente procurou-se obter cortes longitudinais seriados, das duas metades em separado (seção vestibular e lingual) a partir do corte central da polpa dentária e deste ponto à obtenção dos cortes histológicos seriados, o que permitiu analisar todos os cortes e afirmar a não evidência do microrganismo.

A desmineralização realizada com solução citratada de ácido fórmico a 25,0% sob agitação constante durante 15 a 20 dias constitui-se procedimento que pode interferir na visualização e caracterização do microrganismo. Pode ser realizada com ácido fórmico, ácido nítrico, EDTA e outros.

Pesquisas demonstraram que o ácido fórmico e o EDTA promoveram redução severa do número e da capacidade de coloração das Gram-positivas. Estudos verificaram que quando se utiliza o EDTA ou ácido nítrico em substituição ao ácido fórmico, observa-se uma bactéria corada para cada três, ao invés de uma, para cada quinze, respectivamente, em relação à Gram-positiva (Wijnbergen et al.1991). São de difícil distinção as bactérias Gram-negativas coradas em vermelho, se presentes, devido aos componentes teciduais encontrados nos cortes histológicos.

Outra desvantagem da coloração é que nenhuma informação é obtida sobre a viabilidade e patogenicidade. Contudo, exames histológicos de cortes seriados levam a um resultado satisfatório quanto à presença ou ausência de microrganismos na parede pulpar, o que corresponde a um dos objetivos do presente estudo

A análise da dentina remanescente foi realizada sem prévio tratamento com material forrador/antibacteriano, o que não impede a correlação com os outros estudos que introduziram a etapa da medicação com tempo determinado de ação e análise. O que fica evidente é a persistência dos microrganismos após a remoção da cárie, independente da presença ou não do forramento dentário.

Não foi pretensão discriminar as espécies bacterianas persistentes, entretanto a literatura deixa claro a habilidade que o *Streptococcus mutans* apresenta em resistir às alterações nos níveis de ácidos produzidos no ambiente bucal, protegendo seus constituintes orgânicos, em especial o DNA, dos efeitos agressivos da acidificação (Redmo Emanuelsson, 2003).

A sobrevivência de estreptococos bucais tem sido constatada, mesmo após meses ou anos da remoção parcial da cárie e selamento da cavidade (Bjorndal et al. 1997;2000, Lui, 1990), demonstrando a existência de cepas resistentes ao tratamento.

O *S. mutans* considerado o principal patógeno envolvido no processo da cárie dentária é dotado de habilidade em resistir às bruscas alterações de pH, desde a acentuada alcalinidade (Bonecker,2003) aos extremos níveis de acidez (Lui, 1990) .

Além disso, em ambientes com restrição de nutrientes, como em cavidades adequadamente seladas, foi sugerido que o *S. mutans* apresenta capacidade de produzir enzimas glicosídicas e liberar carboidratos de glicoproteínas provenientes do fluido dos túbulos dentinários (Langeland e Jubach, 1981).

Dessa forma, é possível sugerir que características fenotípicas específicas estejam sendo expressas por genótipos de *S. mutans* mais adaptados a sobreviverem e/ou crescerem em ambientes adversos (Bjorndal et al. 2000).

Duque, (2005) ao avaliar a efetividade clínica e microbiológica do tratamento pulpar indireto utilizando dois cimentos de ionômero de vidro modificados por resina e um cimento de hidróxido de cálcio, para todos os grupos de materiais, observou que não houve redução na quantidade de estreptococos do grupo *mutans* e lactobacilos viáveis.

Jubach & Langekand, (1981) em estudo para determinar a viabilidade dos microrganismos por avaliação morfológica em microscopia eletrônica encontraram bactérias, após a remoção clínica da cárie, com membrana de três unidades e glicoprotéínas espalhadas, o que é indicativo de organismos vitais.

A capacidade das bactérias em sobreviverem e persistirem em um determinado ambiente depende, em parte, de sua plasticidade genética inerente, que determina sua habilidade em responder a flutuações nas condições do ambiente e ao estresse (Costa et al 2002).

Dessa forma, a transformação genética natural, poderia ser considerada um importante mecanismo de adaptação às mudanças ambientais, promovendo resistência microbiana, variação genética e rápida evolução dos fatores de virulência (Dahlén, 2000; Duque, 2005; Langeland & Jubach, 1981).

Pôde-se verificar que as bactérias localizavam-se nos túbulos dentinários morfolologicamente inalterados e penetravam seguindo a curvatura dos mesmos, apresentando-se como cone na cárie oclusal, figura 4 (caso 12), estendendo-se em forma de S nos cortes das cáries interproximais, figura 3 (caso 11).

Na zona superficial de penetração de bactérias, os microrganismos seguiram os túbulos dentinários em direção a cavidade pulpar e se espalharam lateralmente na dentina intertubular. Na zona profunda de penetração bacteriana alguns microrganismos espalharam-se apenas junto dos túbulos dentinários, achado histológico que concorda prontamente com o estudo de Ozaki et al. 1994.

A profundidade de penetração bacteriana sujeita-se às características inerentes às bactérias como: fibrilas existentes na parede celular; tendência em formar colônias e capacidade de adaptação aos diferentes meios que constituem-se em barreira física, à incursão dessa no túbulo dentinário.

A estas características Berkiten et al (2000) acrescentam que os prolongamentos odontoblásticos, constituintes do fluido dentinário, disposição e diâmetro tubular seriam fator de impedimento à penetração das bactérias nos túbulos dentinários.

7. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com a metodologia empregada e os resultados obtidos, puderam ser destacadas as seguintes conclusões:

1. Em 56,7% das faces cariadas avaliadas foram detectados microrganismos situados na dentina considerada clinicamente sadia, os quais encontravam-se alojados em túbulos dentinários morfolologicamente inalterados.
2. A localização e a distribuição dos microrganismos nos túbulos dentinários foi variável e independente da profundidade da cárie.

Apesar de alguns estudos terem sido publicados nas últimas décadas sobre os microrganismos e sua persistência nos túbulos dentinários, o diagnóstico clínico da dentina após a remoção do tecido cariado e a situação pulpar frente à bactéria sepultada nos túbulos permanece incerto devido à limitação de métodos de diagnósticos disponíveis e variáveis inerentes à dentina e à bactéria.

Não obstante, o presente estudo veio corroborar com a temática problematizada, ao localizar o microrganismo, em áreas consideradas como críticas, como na junção amelo-dentinária e no assoalho profundo, cuja persistência ocorreu independentemente do grau de cárie.

Em suma, consensualmente a outros autores afirma-se imperativa a realização de novas pesquisas, para melhor e mais abrangente compreensão da dentina contaminada e da resposta pulpar.

8. REFERÊNCIAS

1. Arana V, Katchaburiam E. Complexo dentina polpa. In: **Histologia e Embriologia Oral**, São Paulo: Panamericana, 1999.181-236.
2. Ayna B, Celenk S, Atakul F, Sezgin B, Ozekinci T: Evaluation of clinical and microbiological features of deep carious lesions in primary molars. **J Dent Child** 2003;70:15-8.
3. Bammann LL, Estrela C. Aspectos microbiológicos em endodontia. In: Estrela, Carlos, Figueredo, JAP. **Endodontia- princípios biológicos e mecânicos** ,São Paulo: Artes Médicas, 1999. 167-89.
4. Baumgartner JC. Serum IgG reative with oral anaerobic microorganins associated with infections of endodontic origin. *Oral Microbiol. Imunol.*, v.7, n.2, p.106-110, July 1992.
5. Bergenholtz G. Inflammatory response as the dental pulp to bacterial irritation. **J Endodont.** 1981; 7: 100-4.
6. Biffi JCG, Rodrigues HH, Gomes GS, Teixeira LC, Tamburus JR, Leonardo MR. Avaliação radiográfica e histobacteriológica da cárie dental. **Rer. Ass. Paul. Cirurg. Dent.** 1983; 37(4).
7. Bjorndal L, Larsen T, Thylstrup A. A clinical and microbiological study of deep carious lesion during stepwise excavation using long treatment intervals. **Caries Res** 1997; 31:411-412
8. Bjorndal L, Larsen T. Changes in the cultivable flora in deep carious lesions following a stepwise excavation procedure. **Caries Res** 2000 ;34:502-508.
9. Bonecker M, Toi C, Cleaton-Jones P: Mutans streptococci and lactobacilli in carious gram-dentine before and after Atraumatic Restorative Treatment. **J Dent** 2003;31:423-428.
10. Burnett GW, Scherp HW. . Bacteriologyc studies of the advancing dental lesion. **J Dent Res.** 1951; 30: 766-77.Burnett GW, Scherp HW. . The distribution of proteolytic and aciduric bacteria in the carious lesion. **Oral Surg.** 1951;4:469.

11. Burnett, G.W.; Schuster, G.S. **Microbiologia Oral e Enfermidade infecciosas**. Panamericana., Buenos Aires, 1982, p. 31-70.
12. Carrigan, P.J. A scanning electron microscopic evaluation of human detinal tubules according to age and location. **J of Endod.** 1984;10(8): 359-63.
13. Costa CAS, Nascimento ABL, Teixeira HM. Response of human pulps following acid conditioning and application of a bonding agent in deep cavities. **Dent. Mater.** 2002;18(7), 543-551.
14. Cotter PD, Colin Hill: Surviving the acid test: responses of gram-positive bacteria to low pH. **Microbiol Mol Biol Rev** 2003; 67:429-453.
15. Crone FL. Depep dentinal caries from a microbiological point of view. **Int dent J.** 1968; 18:481.
16. Crone FL. Eksperimentelle undersogelser over akut profund dentincaries. **Tandlaegebladet.**1963; 67:37-9.
17. Dahlén G, Bergenholtz G. Endotoxic activity in teeth with necrotic pulps. **J. Dent. Res.** 1980; 59 (6):1033-1040.
18. Dahlén G, Samulsson W, Molandet A, Reit C. Identification and antimicrobial suceptibility of Enterococci isolated from the root canal. **Oral Microbiol Immunol.** 2000;15:309-12.
19. Dobrint U, Hacker J: Whole genome plasticity in pathogenic bacteria. **Curr Opin Microbiol.**2001;4:550-557.
20. Dorfman A,Stephan RM, muntz JA. In vitro studies on sterilization of carious dentin. II Extent of infection in carious lesions. **J AM Dent Assoc.** 1943;30: 1901-04.
21. Duque, C. **Avaliação clínica e microbiológica de lesões profundas em dentina antes e após remoção incompleta da cárie dentária**. São Paulo: USP, 2005, 151p.
22. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2005.

23. Falster, C.A. et al. Indirect pulp treatment: in vivo outcomes of an adhesive resin system vs calcium hydroxide for protection of the dentin-pulp complex. **Pediatr. Dent.** 2002;24(3);241-248.
24. Faria RA. **Ação do EDTA e NaOCl na morfologia dentinária da região apical do sistema de canais radiculares visualizada através de MEV.** Belo Horizonte, UFMG, 2001, 100p. Tese:(Dissertação)- Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais-UFMG.
25. Farooq NS, Coll J, Kawabara A, Shelton P: Success rate of formocresol pulpotomy and indirect pulp therapy in treatment of deep dentinal caries in primary teeth. **Pediatr Dent** 2000; 22:278-286.
26. Fusayama T, Okuse K, Hosoda H. Relationship between Harness, discoloration and microbial invasion. **J dent Res.** 1966; 45:1033.
27. Garberoglio R, Brännström M. Scanning electron microscopic investigation of human dentinal tubules. **Arch Oral Biol.** 1976; 21: 355-62.
28. Gulabivala, K. Bases biológicas para Endodontia. In: STOCK, C. J. R. *et al* **Atlas colorido e texto de Endodontia.** Rio de Janeiro: Artes Médicas, 1996. Cap.1; 2-4.
29. Hahn CL, Overton B. The effects of immunoglobulins on the convective permeability of human dentine *in vitro*. **Arch Orol Biol.** 1997; 42: 835-843.
30. Hamilton IR, Svensäter G: Acid-regulated proteins induced by *Streptococcus mutans* and other oral bacterial during acid shock. **Oral Microbiol Immunol** 1998; 13:292-300.
31. Jolly M, Sullivan HR. The pathology of carious human dentine. **Aust Dent J.** 1960;5: 157-64.
32. Kennedy WA. Walker WA, Gough RW. Smear layer removal effects on apical leakage. **J Endod.** 1986; 12(1): 21-27.
33. Kidd EAM, Joyston-Bechal S, Beighton D: Microbiological validation of assessments of caries activity during cavity preparation. **Caries Res** 1993;27:402-408.

34. King JB, Crawford JJ, Lindaahl RL. Indirect capping: a bacteriologic study of deep carious dentine in human teeth. **Oral Surg.** 1965; 20: 663-5.
35. Kleter GA. Discoloration of dental carious lesions (a review). **Arch Oral Biol** 1998;43:629-632.
36. Kreulen CM, de Soet JJ, Weerheijm KL, van Amerongen WE. In vivo cariostatic effect of resin modified glass ionomer and amalgam on dentine. **Caries Res** 1997;31:384-389.
37. Langeland D, Jubach T. An electron microscopic study of the viability of microorganism in carious. **J Dent Res.** 1981; 60: 428.
38. Love RM, Jenkinson HF. Invasion of dentinal tubules by oral bacteria. **Crit Rev Oral Biol Med.** 2002; 13(2):171-183.
39. Love RM, Mcmillon MD, Jenkinson HF. Invasion of dentinal tubules by oral Streptococci mediated by the antigen I/II family of polypeptides. **Infect Immun** . 1997;65: 5157-64.
40. Lui T, Gibbons RJ, Hay DI. *Streptococcus cricetus* and *Streptococcus rattus* bind different segment of collagen molecules. **Oral Microbiol Immunol.** 1990; 5: 143-48.
41. Luna, LG. Methods for connective tissue. In: **Histologic staining methods of the Armed Forces.** Institute of Pathology. New York, MacGraw-Hill Book Company, 1960.
42. MacGregor A, Marsland EA, Batty I. Experimental studies of dental caries, I . The reaction of bacterial invasion to softening of the dentine. **Brit. Dent. J.** 1956; 101-230.
43. Maite SMD, Tao L, Pasholoe DH. Fluid and protein flux across the pulpodentin complex of the dog in vivo. **Arch Oral Biol** . 1981;36: 103-10.
44. Maltz M, Oliveira EF, Fontanella V, Bianchi R: A clinical, microbiologic and radiographic study of deep caries lesions after incomplete caries removal. **Quintessence Int** 2002;33:151-159.
45. Miller WD. The micro-organisms of the human mouth. Philadelphia, S.S, whits **Dental Mig.** CO. 1891.

46. Nair, P.N.R. Apical periodontitis: a dynamic encounter between root canal infection and host response. **Periodontology** 2000. 1997;13(1): 29-39.
47. Nisengard, R.J.; Newman, M.G. **Oral Microbiology and Immunology**. 2ª ed Philadelphia, Sauders.1994: 477.
48. Ozaki K, Matsuo, T Nakae, H, Noiri y.; Yoshiyama M, Ebisu S. Comparação quantitativa das bactérias selecionadas em dentina cariada humana por contagem microscópica. **Caries Res**. 1994;28: 137-45
49. Paddick JS, Brailsford SR, Kidd EAM, Beighton D. Phenotypic and genotypic selection of microbiota surviving under dental restorations. **Appl Environ Microbiol** 2005;71:2467-2472.
50. Pashley DH et al. The effects of dentin permeability on restorative dentistry. **Dent. Clin. North Am**. 2002;46(2) :211-245.
51. Pashley Dh, Kepler Ee, Williams Ec, Okabe A. Progressive Decrease in Dentin Permeability FollowingCavity Preparation, **Arch Oral Biol** .1983; 28:853-858.
52. Pashley DH, Livingstone MJ, Outhwaite WC.Rate of Permeation of Isotopes through Human Dentin,in vitro, **JdentRes**. 1977; 56:83-88.
53. Pécora, JD; Guerisoli, DMZ; Estrela, C. Características da Citologia Bacteriana. Programa de incentivo a produção de material didático do SIAE-Pró-Reitorias de Graduação e Pós-Graduação 1997.
54. Quivey Jr. RG, Kuhnert W, Hahn K. Genetics of acid adaptation in oral streptococci. **Crit Rev Oral Biol Med** 2001;12:301-314.
55. Redmo Emanuelsson, I.M. et al. Tracing genotypes of mutans streptococci on tooth sites by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. **Oral Microbiol. Immunol**. 2003;18(1):24-29.
56. Reeves R, Stanley HR. The relation ship of bacterial penetration and pulpal pathosis in carious teeth.Oral Surg. 1966; 22: 59-65.
57. Rodrigues HH, Langeland K. Formic acid na íon exchange resin win 3,000 in tooth desmineralization. **Rev. Fac. Farm. Odont. RP**.1976.;13: 151-54.
58. Rodrigues, HH; Horta, ACL. A agitação como meio auxiliar na desmineralização de tecido duro. **Estomatol. & Cult**, 1977;11:5-9.

59. Shimizu A, Torii Y, Hishida E. Remoção da dentina amolecida usando o critério Tug Back como guia. **J Osaka Univ. Dent. Sch.** 1982; 22: 133-39.
60. Speer ML, Madonia JV, Bauer MA. Quantitative evaluation of the imunocompetence of the dental pulp. **J Endod.** 1977;3:418-23
61. Stephan RM, Muntz JA, Dorfman A. In vitro studies on sterilization of carious dentin. III. Effective penetration of germicides into carious lesions. **J Aer Dent Ass.** 1943; 30: 1905-08.
62. Taylor RD. Modification of the Brown and Brenn Gram stain for the differential staining of gram-positive and gram-negative bacteria in tissue sections. **Amer. J. Clin. Path.** 1966. 46: 472-476.
63. Ten Cate, AR. **Histologia e Embriologia Dental – Desenvolvimento Estrutura e Função.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. Cap.10:129-60.
64. Thomas EL, Pera KA: Oxygen metabolism of Streptococcus mutans: uptake of oxygen and release of superoxide and hydrogen peroxide. **J Bacteriol** 1983;154:1236-1244.
65. Trowbridge, HO; Kim, S. Desenvolvimento, estrutura e função da polpa. In: Cohen, S; Burns, R C. **Caminhos da Polpa**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. Cap.11:364-99.
66. USP, 100p. Tese (Doutorado)– Programa de Pós –Graduação em Odontologia, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de São Paulo, 1998.
67. Van Hassel HJ. Rationale of the conference on inflammation. **J Endod.** 1977;3 : 207-9.
68. Wambier DS. **Estudo microbiológico e em microscopia eletrônica de varredura da cárie de dentina, após selamento com ionômero de vidro resinoso.**São Paulo:
69. Warfvinge J, Dahle G, Bergenholtz G.Dental Pulp Response to Bacterial Cell Wall Material **J Dent Res.** 1985; 64(8):1046-1050.
70. Weerheijm KL, Kreulen CM, de Soet JJ, Groen HJ, van Amerongen WE. Bacterial counts in carious dentine under restorations: 2-years in vivo effects. **Caries Res.** 1999;33:130-134.

71. Wijnbergen M, Van muller PJ. Effects of histological descalcifying agents an number and stainability of Gram-positive bacteria. **J Dent Res.** 1987; 66(5): 1029-31.
72. Wijnbergen M, Van muller PJ. The cumalative effect of desinfection, storage histological fixation and desmineralization on number and straing ability positive bacteria. **J. Int. Endod.** 1991; 5(24): 243-48.

ANEXO 1 – Aprovação do comitê de ética em pesquisa



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP
Av. João Naves de Ávila, nº 2160 - Bloco J - Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG -
CEP 38400-089 - FONE/FAX (034) 239-4131

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA Nº 211/04

Registro CEP: 148/04

Projeto Pesquisa: *“Avaliação histobacteriológica do remanescente dentinário após a remoção clínica da cárie em pré-molares humanos”.*

Pesquisador Responsável: Daniele Alves de Oliveira

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, o CEP manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: Projeto aprovado.

Uberlândia, 17 de setembro de 2004.


Prof. Dr. Alcino Eduardo Bonella
Coordenador do CEP/UFU

Orientações ao pesquisador:

(Para parecer Aprovado ou Aprovado com Recomendações)

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 - Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.3.z), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa (Item V.3) que requeiram ação imediata.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, item III.2.e). O prazo para entrega de relatório é de 120 dias após o término da execução prevista no cronograma do projeto, conforme norma da Res. 196/96 CNS.

Anexo 2 – Soluções e etapas da técnica de Hematoxilina e Eosina (H. E.)

1-Soluções

1.1 Hematoxilina de Harris

Hematoxilina (cristais)		5g
Álcool absoluto		50 ml
Alúmen de potássio		100 g
Água destilada		
1000ml		
Óxido de mercúrio amarelo		2,5 g

1.2 Eosina

Solução de eosina		1,0%
Solução A- Eosina		1g
Água destilada		20ml
Após a dissolução adicionar:		
Álcool 95%		80ml

Diluir uma parte de eosina para três partes de álcool 80% e adicione 0,5 ml de ácido acético glacial por 100ml de solução.

2- Fixador: indiferente

3- Método de coloração:

3.1- Desparafinização

xilol 1		15 minutos
xilol 2		15 minutos

3.2- Hidratação

álcool absoluto1		2 segundos
álcool absoluto 2		2 segundos

álcool absoluto 3.....	2 segundos
álcool 95%	2 segundos
álcool 70%	2 segundos
água corrente	5 minutos

3.3 Coloração

Hematoxilina	5 minutos
lavar em água	tirar excesso
diferenciador	2 segundos
lavar em água corrente.....	10 minutos
Eosina	5 minutos

3.4 Desidratação

álcool 70%	2 segundos
álcool 95%	2 segundos
álcool absoluto 1.....	2 segundos
álcool absoluto 2.....	2 segundos
álcool absoluto 3.....	2 segundos
xilol 1	2 segundos
xilol 2	2 segundos
xilol 3	2 segundos

4 –Montagem das laminas com cortes corados com resina Permout e laminula

Anexo 3 – Soluções e etapas da coloração Tricrômico de Masson

1 Soluções

Hematoxilina férrica (Weigert)

Fucsina ácida (escarlata de Beibrich)

Solução fosfotúngstica 5,0% - ácido fosfomolibdico 5,0%

Azul de anilina-acética

Ácido acético solução aquosa 1,0%

Fixador

Se o tecido estiver fixado em formalina 10,0%, refixar em Bouin aquecido a 56° C por uma hora ou durante uma noite em temperatura ambiente.

Método de coloração

Desparafinar;

Lavar em água de torneira até por uma hora até desaparecer o cor do fixador;

Lavar em água destilada por cinco minutos;

Corar em hematoxilina férrica de Weigert ou de Harris, durante cinco minutos;

Lavar em água de torneira por cinco minutos;

Lavar em água destilada por cinco minutos;

Corar pela fucsina ácida-escarlata de Biebrich por cinco minutos (conservar o corante);

Lavar em água destilada por dez minutos (remover excesso de corante);

Tratar pelo ácido fosfotúngstico-ácido fosfomolibdico por dez minutos;

Sem lavar, corar pelo azul de anilina-acética por dez minutos;

Lavar em água destilada por cinco minutos;

Lavar em solução de ácido acético 1,0% por três minutos;

Desidratar;

Montar.

Anexo 4 – Soluções e etapas do método de Brown e Brenn

1 Soluções

1.1 Solução de Iodo (Iugol)

Iodo	1g
Iodeto de potássio	2 g
Água destilada	300ml

1.2 Solução de Galego

Formaldeído	1 g
Ácido acético glacial	0,5 ml
Água destilada	50 ml

1.3 Solução Cristal de Violeta

Cristal de violeta	1 g
Álcool etílico	10 ml
Ácido carbólico	2 g
Água destilada	100ml

1.4 Solução de Fucsina Básica

Fucsina	0,25 g
Água destilada	100ml

1.5 Solução de Ácido Pícrico

Ácido pícrico	0,1 g
Acetona	100 ml

2 Etapas da coloração de Brown e Brenn

1. Desparafinizar e hidratar;
2. Corar com Hematoxilina de Herris por cinco minutos;
3. Diferenciar por um minuto;

4. Lavar em água corrente por cinco minutos;
5. Corar com solução de Cristal Violeta por dois minutos;
6. Remover o excesso e cobrir os cortes com solução de Lugol por um minuto;
7. Remover o excesso e diferenciar os cortes em éter/acetona;
8. Lavar em água destilada;
9. Corar com solução de fucsina por três minutos;
10. Lavar em água destilada;
11. Diferenciar em solução de Galego por três minutos;
12. Lavar em água destilada;
13. Lavar em acetona;
14. Diferenciar em solução de ácido pícrico;
15. Lavar em acetona;
16. Lavar em mistura de partes iguais de acetona e xilol por 15 minutos;
17. Lavar em cinco banhos de xilol;
18. Montar com resina Permunt.