

# **DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgG PARA *Porphyromonas gingivalis* (*Bacteroides gingivalis*) e *Prevotella intermedia* (*Bacteroides intermedius*) EM LESÕES PERIAPICAIS CRÔNICAS PELA TÉCNICA DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA.**

**DETECTION OF IgG ANTIBODIES TO *Porphyromonas gingivalis*  
(*Bacteroides gingivalis*) and *Prevotella intermedia* (*Bacteroides*  
*intermedius*) IN CHRONIC PERIAPICAL LESIONS BY  
IMMUNOFLUORESCENCE.**

**Regina Stela Stilac ROCHA \***

**Odila Pereira da Silva ROSA \***

**Marcos Aquira MITSUNAGA \*\***

## **RESUMO**

**L**esões periapicais crônicas foram avaliadas pela técnica de imunofluorescência indireta com o propósito de estimar a presença de anticorpos IgG específicos para o *Bacteroides gingivalis* e *Bacteroides intermedius*. Das 15 amostras examinadas, 7(46,6%) apresentaram reatividade anticórpica.

## **UNITERMOS**

Lesões periapicais; Imunologia; Imunoglobulinas.

---

\* Professora Doutora da Disciplina de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Odontologia de Bauru-USP.

\*\* Ex-aluno do Curso de Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia de Bauru-USP.

## INTRODUÇÃO

As infecções dos canais radiculares são causadas pela microbiota indígena da cavidade bucal que invade a polpa, tecido com capacidade limitada de cura após repetidos insultos bacterianos. Estudos clássicos conduzidos por KAKEHASHI et al.<sup>20</sup>, SUNDQVIST<sup>36</sup> e por SUNDQVIST et al.<sup>37</sup> demonstraram definitivamente o papel fundamental das bactérias no desenvolvimento das alterações pulpares e periapicais.

Anteriormente, as pesquisas sobre as infecções endodônticas eram extremamente limitadas, a ponto das bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas serem consideradas como predominantes. A partir de 1970, com o desenvolvimento e aprimoramento das técnicas anaeróbias, houve uma mudança no entendimento dessas infecções<sup>1,3,9,16,23,25</sup> no sentido de valorizar os anaeróbios estreitos<sup>5,6,7,8,31,33,41,42,46</sup>.

No momento há um consenso entre os pesquisadores em considerar as infecções dos canais radiculares usualmente como polimicrobianas, dominadas pelos anaeróbios<sup>4,31,33,34,36,48</sup>, lembrando que as condições ecológicas do tecido pulpar necrótico favorecem o predomínio de anaeróbios estreitos<sup>13</sup>.

Dentre os anaeróbios estreitos detectados nas infecções pulpares e periapicais destacam-se certas espécies de Bacteroides negros, tais como o Bacteroides endodontalis, o Bacteroides gingivalis e o Bacteroides intermedius<sup>5,13,21,32,41,42,43,46</sup>, as quais possuem ou podem produzir fatores de virulência de relevância para a patogênese das lesões endodônticas. Referidos fatores incluem a endotoxina, que pode determinar a reabsorção óssea "in vitro"<sup>15,30</sup>; a cápsula bacteriana, capaz de inibir a fagocitose pelas células do hospedeiro<sup>18</sup>; enzimas histolíticas como a tripsina e colagenase, responsáveis pela degradação do tecido conjuntivo<sup>14,24</sup> e os produtos do metabolismo.

SUNDQVIST<sup>36</sup>, com o emprego de técnicas anaeróbias, detectou os Bacteroides negros em todos os canais radiculares de dentes apresentando áreas periapicais radiolúcidas e, as espécies mais frequentemente observadas foram: Bacteroides intermedius, Bacteroides endodontalis e Bacteroides melaninogenicus. Segundo GRIFFEE et al.<sup>11</sup> existe

uma alta correlação entre a presença dos Bacteroides negros nas infecções dos canais radiculares e a ocorrência de sintomas clínicos.

Pela técnica de imunofluorescência indireta PANTERA et al.<sup>32</sup> detectaram os Bacteroides negros em 57% e 66% das amostras de polpa e periapicais, respectivamente. O Bacteroides intermedius foi a espécie encontrada com maior frequência (43%), seguida pelo Bacteroides endodontalis (16%) e Bacteroides gingivalis (15%).

No estudo bacteriológico de 62 canais radiculares infectados conduzido por HAAPASALO<sup>13</sup>, foi verificado que as infecções via de regra eram mistas e com predomínio de anaeróbios, particularmente de Bacteroides negros. O autor observou, também, que o Bacteroides intermedius era a espécie mais encontrada, e que o Bacteroides endodontalis e Bacteroides gingivalis estavam presentes principalmente nos quadros de infecção aguda, sugerindo uma virulência maior para essas duas últimas espécies.

As lesões periapicais crônicas de origem pulpar representam áreas de resposta inflamatória para o conteúdo dos canais radiculares, principalmente as bactérias e os seus produtos, considerados como抗ígenos potentes. Destarte, os canais radiculares pelo fato de acomodarem uma série de抗ígenos passam a representar uma rota eficiente de sensibilização do hospedeiro, através da qual pode ser induzida tanto uma resposta inflamatória inespecífica, como uma reação imunológica mediada pelos linfócitos T e/ou pelas imunoglobulinas ao nível dos tecidos periapicais<sup>40</sup>.

Compatível com essa hipótese é o encontro de células inflamatórias e imunocompetentes<sup>35</sup>, e de imunoglobulinas<sup>10,22,26,27,29,38</sup> e de complexos imunes<sup>22,27,39</sup> nos cistos e granulomas periapicais. Embora as reações imunológicas inicialmente desempenhem um papel protetor para os tecidos periapicais contra os抗ígenos oriundos dos canais radiculares, danos teciduais são também inevitáveis<sup>21</sup> culminando por vezes com a perpetuação do processo inflamatório<sup>39,40</sup>. Na tentativa de proporcionar mais informações sobre a patogênese das lesões periapicais crônicas, foi considerado de interesse averiguar a esse nível a presença da imunoglobulina G com especificidade para o Bacteroides gingivalis e Bacteroides intermedius.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram selecionados 15 indivíduos, de ambos os sexos, na Clínica de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Bauru - USP, diagnosticados radiograficamente como portadores de lesões periapicais crônicas. A presença de cárie dental, fístula, canal obturado, inchaço, dor provocada ou espontânea e de bolsa periodontal profunda na região a ser amostrada, foi devidamente registrada.

Todas as lesões foram colhidas assepticamente após a exodontia e cuidadosamente lavadas por duas vezes com solução fisiológica estéril a 4°C, sob leve agitação em Vortex durante 1 minuto.

Após a secagem em papel de filtro, cada amostra foi pesada em balança de precisão Mettler P-160, seu peso anotado e depois finamente cortada sobre uma placa de vidro previamente resfriada.

Os fragmentos assim obtidos foram transferidos para um homogeneizador de tecido (Arthur H. Thomas, Co.), a eles adicionados 2 µl de solução fisiológica estéril por miligrama de tecido, e homogeneizados sob resfriamento constante durante 15 minutos. O líquido sobrenadante foi coletado com pipeta de Pasteur após a centrifugação do homogeneizado em centrífuga Internacional (Modelo PR-6), a 2500xg por 20 minutos.

Para a detecção de anticorpos IgG específicos para o Bacteroides gingivalis e Bacteroides intermedius no líquido sobrenadante, obtido a partir da homogeneização da lesão, foi empregada a técnica de imunofluorescência de WELLER;COONS<sup>45</sup>, sobre esfregaços com os microrganismos.

O estudo da fluorescência foi conduzido utilizando microscópio Zeiss (Modelo RA) com luz incidente, tendo como fonte luminosa uma lâmpada de halogênio, objetiva Neofluar de 100x, ocular KPL de 8x, filtro excitador BP 546 e filtro barreira LP 590. A fluorescência foi graduada de 1<sup>+</sup> a 4<sup>+</sup> e, considerados positivos os graus 3<sup>+</sup> e 4<sup>+28</sup>.

## RESULTADOS

Das 15 lesões periapicais crônicas examinadas pela técnica de imunofluorescência indireta, 46,6% apresentaram reatividade anticórica para as bactérias em estudo. A tabela I lista os pacientes amostrados e os

resultados obtidos. Das sete lesões positivas, duas apresentaram reatividade anticórica para ambas as bactérias.

TABELA I - detecção de anticorpos IgG para o Bacteroides gingivalis e Bacteroides intermedius em lesões periapicais pela técnica de imunofluorescência direta.

paciente número	diagnóstico presuntivo	bacteroides gingivalis	bacteroides intermedius	DENTE
01	granuloma A	-	-	ILSE
02	granuloma	-	-	2º PMSD
03	cisto B	-	+	ICSD
04	cisto B,D	+	+	CSE
05	cisto	-	+	ILSE
06	granuloma	-	-	2º MID
07	cisto C	+	-	ICSE
08	cisto B	-	-	2º PMSE
09	cisto B	+	+	ILSE
10	cisto B,C	-	-	ILSD
11	granuloma	+	-	1º MIE
12	granuloma A,D	-	-	1º MID
13	cisto D	-	+	1º MID
14	granuloma D	-	-	1º MID
15	granuloma D	-	-	1º MID
Total de Positivos		4	5	

A comunicação periodontal

B canal obturado

C fístula

D sensibilidade dental

## DISCUSSÃO

Embora os relatos passados sobre a presença de microrganismos nas lesões periapicais crônicas sejam inconclusivos<sup>12,47</sup>, IATROU et al.<sup>17</sup>, empregando técnicas de cultura anaeróbias consideraram a microbiota dos cistos radiculares infectados como polimicrobiana e, em 29,8% dos casos observaram bacilos Gram negativos anaeróbios.

Recentemente, IWU et al.<sup>19</sup> detectaram números significantes de microrganismos em granulomas periapicais, com espécies semelhantes àquelas encontradas no tecido pulpar necrótico. Mas, como a maioria dos dentes avaliados apresentava canais obturados, julgaram possível que as bactérias tivessem sido introduzidas nos tecidos periapicais via canal durante o tratamento endodôntico.

Pela técnica de imunofluorescência indireta PANTERA et al.<sup>32</sup> constataram em 66% das áreas periapicais radiolúcidas e em 57% das amostras de polpas necróticas examinadas a presença de Bacteroides negros.

Os Bacteroides negros vêm se destacando como microrganismos de relevância na patogênese das alterações pulparas e periapicais<sup>5,13,21,32,41,42,43,46</sup>; por apresentarem fatores potentes de

virulência<sup>14,15,18,24,30,44</sup> responsáveis pela degradação tecidual, particularmente o Bacteroides intermedius, o Bacteroides gingivalis e o Bacteroides endodontalis.

Apesar da controvérsia relativa à presença de bactérias nas lesões periapicais crônicas, é significante o conceito que os produtos dos Bacteroides oriundos dos canais radiculares podem ser tão importantes quanto a real presença desses microrganismos na área periapical<sup>40</sup>.

Por meio desse raciocínio fica fácil o entendimento que, em consequência da necrose pulpar os canais radiculares passam a acomodar uma variedade enorme de抗ígenos, incluindo os de Bacteroides negros, que por essa trajetória encontram acesso para os tecidos periapicais, podendo desencadear a esse nível uma reação imunológica.

Histologicamente essa hipótese é suportada pelo encontro nos cistos e granulomas de células envolvidas na resposta imune<sup>35</sup> e, para GREENING;SCHONFELD<sup>10</sup> a presença de plasmócitos nessas lesões seria indicativa da síntese de imunoglobulinas. Das imunoglobulinas observadas em lesões periapicais crônicas<sup>22,26,27,29,38</sup> a IgG têm sido a classe dominante<sup>10,29</sup> embora pouco tenha sido mencionado sobre sua especificidade anticórica.

A presente pesquisa proporcionou evidência da presença de anticorpos IgG específicos para o Bacteroides intermedius e Bacteroides gingivalis em 33,3% e em 26,6% das lesões periapicais crônicas avaliadas, respectivamente.

Esse evento reveste-se de importância, pois se抗ígenos do B. intermedius e/ou do B. gingivalis, em ligeiro excesso, interagirem com os anticorpos IgG específicos pode acontecer a formação de complexos imunes, com a consequente ativação do sistema complemento e liberação de fragmentos biologicamente ativos, tais como C3a, C5a e C567. Esses fragmentos, dentre outras atividades, são quimiotáticos para os polimorfonucleares que, ao entrarem em contato com os complexos imunes, liberam enzimas potentes capazes de produzir injúria tecidual<sup>2</sup>.

A presença de complexos imunes nas lesões periapicais crônicas<sup>22,27,39</sup>, de certa maneira, serve para explicar parcialmente como essas lesões gradualmente progredem, em termos de perpetuação da perda óssea

periapical<sup>40</sup>. A própria ativação do complemento tem sido implicada como um mecanismo de estimulação osteoclastica<sup>10</sup>.

Cumpre esclarecer, apesar dos resultados aqui obtidos, que o modo como esses irritantes antigênicos determinam a destruição localizada dos tecidos, a inflamação e a perda óssea na área periapical, é atualmente motivo de muitas especulações. Por essa razão deve ser realçada a idéia que as reações por complexos imunes, bem como as outras reações imunológicas, podem ser freadas se os抗ígenos forem adequadamente removidos dos condutos. Tal colocação enfatiza o conceito que a limpeza completa e o debridamento dos canais radiculares são fundamentais na terapia endodôntica<sup>39</sup>.

## CONCLUSÃO

A avaliação de 15 lesões periapicais crônicas pela técnica de imunofluorescência indireta demonstrou que anticorpos IgG para o Bacteroides intermedius e Bacteroides gingivalis podem ser detectados, sugerindo a ocorrência de uma reação imunológica a esse nível.

## ABSTRACT

Fifteen human dental periapical lesions were obtained and examined to verify the presence of immunoglobulin G with anticorpic specificity to the Bacteroides intermedius and Bacteroides gingivalis by employing the immunofluorescence technique. Seven (46,6%) of the specimens examined were positive.

## UNITERMS

Periapical lesions; Immunology ; Immunoglobulins.

## AGRADECIMENTOS

Ao Dr.Dennis E. Lopatin, da University of Michigan, pelas cepas de Bacteroides intermedius e Bacteroides gingivalis. E ao CNPq pela Bolsa de Iniciação Científica do então acadêmico Marcos Akira Mitsunaga.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1-ARANKI,A.;FRETER,R. Use of anaerobic glove boxes for the cultivation of strictly anaerobic bacteria. *Amer. J. clin. Nutr.*, v.25, p.1329-34, 1992.
- 2-BELLANTI, J.A. *Immunology II*. Philadelphia, Saunders, 1978. p.310-6.
- 3-BERG,J.O.;NORD,C.E. A method for isolation of anaerobic bacteria from endodontic specimens. *Scand. J. dent. Res.*, v.81, p.163-6, 1973.

- 4-BERGENHOLTZ,G. Microorganisms from necrotic pulps of traumatized teeth. *Odont. Revy*, v.25, n.4 , p.347-58, 1974.
- 5-BROOK,I.; GRIMM,S.; KIELICH,R. Bacteriology of acute periapical lesions in children. *J. Endod.*, v.7, n.8, p.378-80, Aug. 1981.
- 6-BUSCH,D.F. Anaerobes in infections of the head and neck and ear nose, and throat. *Rev. Infect. Dis.*, v.6, p.115-22, Mar./Apr. 1984, Supplemento 1.
- 7-DUNN,D.L.;SIMMONS,R.L. The role of anaerobic bacteria in intraabdominal infections. *Rev. Infect. Dis.*, v.6, p.139-46, 1984, Supplemento 1.
- 8-FINEGOLD,S.M. *Anaerobic bacteria in human disease*. New York Academic Press, 1977 apud HAAPASALO,M. *Bacteroides* spp. in dental root infection. *Endod. dent. Traumat.*, v.5, n.1, p.1-10, Feb. 1989.
- 9-FULGUM,R.S. Mobile anaerobe laboratory. *J. appl. Micro-biol.*, v.21, p.769-70, 1971.
- 10-GREENING,A.B.;SCHONFELD,S.T. Apical lesions contain elevated immunoglobulin G levels. *J. Endod.*, v.6, n.12, p.867-9, Dec. 1980.
- 11-GRIFFEE,M.B. et al. The relationship of *Bacteroides melaninogenicus* to symptoms associated with pulpal necrosis. *Oral Surg.*, v.50, n.5, p.457-61, Nov. 1980.
- 12-GROSSMAN,L.T. Bacteriologic status of periapical tissue in 150 cases of infected pulpal teeth. *J. dent. Res.*, v.37, n.1, p.67, Feb. 1958.
- 13-HAAPASALO,M. *Bacteroides* spp. in dental root infection. *Endod. dent. Traumat.*, v.5, n.1, p.1-10, Feb. 1989.
- 14-HAUSMANN,E.;KAUFMAN,E. Collagenase activity in particulate fraction from *Bacteroides melaninogenicus*. *Biochim. Biophys. Acta*, v.194, p.612-5, 1969.
- 15-HAUSMANN,E.;RAISZ,L.G.;MILLER,W.A. Endotoxin stimulation of bone resorption in tissue culture. *Science*, v.168, n.3933 , p.862-4, May, 1970.
- 16-HOLDEMAN,L.V. et al. *Anaerobe laboratory manual*. 4 ed. Blacksburg, VPI Anaerobe Laboratory, 1977.
- 17-IATROU,I.A. et al. Anaerobic bacteria in jaw cysts. *Brit. J. oral Maxillofac. Surg.*, v.26, n.1, p.62-9, Feb. 1988.
- 18-INGHAM,N.R. et al. Phagocytosis and killing of bacteria in aerobic and anaerobic conditions. *J. Med. Microbiol.*, v.14, p.391-9, 1981.
- 19-IWU,C. et al. The microbiology of periapical granulomas. *Oral Surg.*, v.69, n.4 , p.502-5, Apr. 1990.
- 20-KAKEHASHI,S.; STANLEY,H.R.; FITZGERALD,R.I. The effect of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg.*, v.20, n.3, p.340-9, Sept. 1965.
- 21-KEUDELL,K. et al. Humoral antibodies to anaerobic bacteria isolated from patients with pulpal-periapical disease. *Oral Surg.*, v.53, n.2, p.194-7, Feb. 1982.
- 22-KUNTZ,D.D. et al. Localization of immunoglobulins and the third component of complement in dental periapical lesion. *J. Endod.*, v.3, n.2, p.68-73, Feb. 1977.
- 23-LEV,M.; KEUDELL,K.C.; MILFORD,A.F. Succinate as a growth factor for *Bacteroides melaninogenicus*. *J. Bacteriol.*, v.108, n.1, p.175-8, Oct. 1971.
- 24-MERGENHAGEN,S.E. et al. Preparation and biological activities of endotoxins from bacteria. *J. Infect. Dis.*, v.108 , p.304-10, 1961.
- 25-MOORE,W.E.C. Techniques for routine culture of fastidious anaerobes. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v.16, p.173-90, 1966.
- 26-MORSE,D.R. et al. Presence of immunoglobulin producing cells in periapical lesions. *J. Endod.*, v.1, n.10 , p.338-43, Oct. 1975.
- 27-MORTON,T.H. et al. Role of immune complexes in human periapical periodontitis. *J. Endod.*, v.3, n.17 , p.261-8, July 1977.
- 28-MOUTON,C. et al. Identification of *Bacteroides gingivalis* by fluorescent antibody staining. *Ann. Microbiol.*, v.132 , p.69-83, 1981.
- 29-NAIR,B.C. et al. Biological effects of a purified lipo-polysaccharide from *Bacteroides gingivalis*. *J. Periodont. Res.*, v.18, n.1, p.40-9, 1983.
- 30-NAIRDORF,I.J. Immunoglobulins in periapical granulomas: a preliminary report. *J. Endod.*, v.1, n.1 , p.15-8, Jan. 1975.
- 31-NEWMAN,M.G. Anaerobic oral and dental infections. *Rev. Infect. Dis.*, v.6 , p.107-14, 1984.
- 32-PANTERA,E.A.; ZAMBON,I.I.; SHIH-LEVINE,M. Indirect immuno-fluorescence for the detection of *Bacteroides* species in human dental pulp. *J. Endod.*, v.14, n.5 , p.218-23, May 1988.
- 33-SABISTON,C.B.;GOLD,W.A. Anaerobic bacteria in oral infection. *Oral Surg.*, v.38, n.92 , p.187-92, Aug. 1974.
- 34-SABISTON,C.B. et al. Bacterial study of pyrogenic infections of dental origin. *Oral Surg.*, v.41, n.4, p.430-5, Apr. 1976.
- 35-STERN,M.H. et al. Quantitative analysis of cellular composition of human periapical granuloma. *J. Endod.*, v.7, n.3, p.117-22, Mar. 1981.
- 36-SUNDQVIST,G. Bacteriological studies of necrotic dental pulps. Umea University Odontological Dissertation Umea, Sweden: University of Umea, 1976 apud HAAPASALO,M.
- 37-SUNDQVIST,G. et al. Capacity of anaerobic bacteria from necrotic dental pulp to induce purulent infections. *Infect. Immun.*, v.25, n.2, p.685-93, Aug. 1979.
- 38-TOLLER,P.A.;HOLBOROW,E.J. Immunoglobulins and immuno-globulin-containing cells in cysts of the jaws. *Lancet*, v.26, n.7613, p.178-81, July 1969.
- 39-TORABINEJAD,M.;KETTERING,J.D. Detection of immune complexes in human periapical lesions by anticomplement immuno-fluorescence technique. *Oral Surg.*, v.48, n.3, p.256-61, Sept. 1979.
- 40-TORABINEJAD,M.;BAKLAND,L.K. Immunopathogenesis of chronic periapical lesions. *Oral Surg.*, v.46, n.5 , p.685-99, Nov. 1978.
- 41-VAN STEENBERGEN,T.J.M. et al. *Bacteroides endodontalis* spp. an asaccharolytic black-pigmented *Bacteroides* species from infected dental root canals. *Int. Syst. bacteriol.*, v.34, p.118-20, 1984.
- 42-VAN WINKELHOFF,A.J.;GRAAFF,J. *Bacteroides endodontalis* and other black-pigmented *Bacteroides* species in odontogenic abscesses. *Infect. Immun.*, v.49, n.3, p.494-7, Sept. 1985.
- 43-VAN WINKELHOFF,A.J.; VAN STEENBERGEN,T.J.M.; DE GRAAFF,J. The role of black-pigmented *Bacteroides* in human oral infections. *J. Clin. Periodont.*, v.15, n.3, p. 145-55, 1988.
- 44-WEISS,C. The pathogenicity of *Bacteroides melaninogenicus* and its importance in surgical infections. *Surgery*, v.13, p.683-91, 1943.
- 45-WELLER,T.H.;COONS,A.H. Fluorescent antibody studies with agents of varicella and herpes zoster propagated in vitro. *Proc. Soc. exp. Biol.*, v.86, p.789-94, 1954.
- 46-WILLIAMS,B.L. et al. Bacteriology of dental abscesses of endodontic origin. *J. clin. Microbiol.*, v.18, n.4, 770-4, Oct. 1983.
- 47-WINKLER,K.C.;VAN AMERONGEN,J. Bacteriologic results from 4000 root canal cultures. *Oral Surg.*, v.12, n.7, p.857-75, July, 1959.
- 48-WITTGOW,W.C.;SABISTON,B.B. Microorganisms from pulpal chambers of intact teeth with necrotic pulps. *J. Endod.*, v.1, n.5, p.168-71, May 1975.