

MARIANA RAMOS DA SILVA

**Caracterização clínica e histológica da mucosa gengival
bucal em cães (*Canis familiares*) portadores de doença
periodontal**

RECIFE-PE

2006

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

**Caracterização clínica e histológica da mucosa gengival
bucal em cães (*Canis familiares*) portadores de doença
periodontal**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Fabrício Bezerra de Sá

Co-orientador: Marco Antônio Gioso

Recife-PE

2006

Ficha Catalográfica
Setor de Processos Técnicos da Biblioteca Central – UFRPE

Silva, Mariana Ramos
Caracterização clínica e histológica da mucosa gengival bucal
de cães (Canis familiares) portadores de doença periodontal / Mariana
Ramos da Silva – 2006
41f.

Orientador: Fabrício Bezerra de Sá
Co-orientador: Marco Antônio Gioso
Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) –
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Departamento de Medicina Veterinária
Inclui bibliografia.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PENAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

**CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E HISTOLÓGICA DA MUCOSA GENGIVAL BUCAL
EM CÃES (Canis familiares) PORTADORES DE DOENÇA PERIODONTAL**

Dissertação de Mestrado elaborada por

MARIANA RAMOS DA SILVA

Aprovada pela Banca Examinadora

Prof. Dr. Fabrício Bezerra de Sá (Orientador)
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Profa. Dra. Liriane Baratella Evencio
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Miriam Nogueira Teixeira
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof. Dr. Eduardo Ferreira Cole
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof. Dr. Joaquim Evêncio Neto
Universidade Federal Rural de Pernambuco

RESUMO

A doença periodontal é caracterizada clínica e histologicamente por alterações na consistência e perda de inserção clínica em virtude da degradação dos componentes da matriz extracelular associada ao infiltrado de células inflamatórias no tecido gengival. Nosso trabalho tem como objetivo caracterizar e correlacionar aspectos clínicos e histológicos da inflamação, em seus diferentes graus, no epitélio gengival dos quartos pré-molares superiores de cães, de acordo com a quantidade de células (mono ou polimorfonucleares), concentração de fibras colágenas, vascularização e espessura do epitélio. No presente estudo, após avaliação clínica pormenorizada, foram obtidas amostras da gengiva livre de 21 cães portadores de doença periodontal em diferentes graus, coletado um fragmento por animal, e comparados a fim de caracterizar o estágio em que se encontra cada amostra através de análise histológica de biópsia do epitélio gengival marginal. Cada fragmento foi subdividido em três porções: I - coronal, II - média e III - apical, para um estudo mais preciso e os resultados confrontados entre si e entre os fragmentos, totalizando 63 segmentos analisados. Os cortes foram avaliados histologicamente utilizando-se a técnica de coloração hematoxilina e eosina e tricromo de gomori. Os resultados revelaram diferenças significativas entre número de células inflamatórias dos grupos I, II e III de uma mesma amostra de acordo com a severidade da doença periodontal sugerindo que sua progressão pode estar diretamente relacionada com a perda das fibras de colágeno e diminuição na espessura do epitélio observadas durante os estágios da doença. Finalmente, a avaliação quantitativa da fração da área ocupada por fibras de colágeno gengival pode refletir a severidade clínica da doença periodontal.

Palavras-chave: odontologia veterinária, gengiva, periodontopatia, cães.

ABSTRACT

Periodontal disease is clinical and histological characterized by the degradation of extracellular matrix components associated with a gingival infiltration of inflammatory cell populations. The purpose of the present study was to characterize the inflammatory stages in gingival epithelium of the first upper molar according to the number of cells (mono and polimorfonuclear), concentration of collagen fibers, vascularization and gingival thickness. Samples of free gingival of 21 dogs with different degrees of periodontal disease were collected, one fragment for each animal and compared in order to characterize the different stages of each sample through histological analysis of biopsy from marginal gingival epithelium. For a precise study and to compare each fragment and each portion of the fragment they were subdivided in three portions: I – coronal, II – medium, III – apical. The cuts were evaluated histologically by hemaxoxilin and eosin coloration and tricromic of gomori. Our results showed significant differences in the number of inflammatory cells of groups I, II and III according to severity of periodontal disease and suggests that its progression can be directly related with loss of collagen fibers and decrease in epithelium thickness. Observed in different stages of this disease. Finally quantitative evaluation of the fraction containing gingival collagen fibers may reflect severity in periodontal clinical disease.

Key-words: Veterinary dentistry, gingiva, periodontopathy, dogs

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Imagem de exploração do sulco gengival com sonda milimetrada em dente quarto pré-molar superior de um cão 21
- Figura 2 (a) Região vestibular de quarto pré-molar superior de cão e após a realização da biópsia (b) 22
- Figura 3 Detalhe do fragmento gengival biopsado da região vestibular do dente 4º pré-molar superior direito 22
- Figura 4 Ilustração esquemática de corte vestibulo-lingual da gengiva livre mostrando as áreas analisadas. EG = epitélio gengival (segmentos I, II e III), EJ = Epitélio juncional, TC = Tecido conjuntivo (colágeno) 23
- Figura 5 1.Fotomicrografia do epitélio gengival (a) e corte transversal evidenciando seu conjuntivo que se intercala em forma de cristas conjuntivas. 2. Fotomicrografia de um fragmento de epitélio gengival submetido a análise e processamento de imagem para determinação da espessura do epitélio (H.E. – 100X) 25
- Figura 6 Corte vestibulo-lingual de uma gengiva normal de cão. O epitélio gengival (EG) fusiona-as com o epitélio juncional

(EJ), cobrindo a superfície do esmalte (ES). TC = tecido conjuntivo (T.G. – 100X) 26

- Figura 7 Doença periodontal inicial. **A** - Gengivite inicial apresentando tecido ainda preservado sem alterações clínicas significativas. **B** - Epitélio gengival bem próximo do normal com camadas bem definidas e infiltrado celular discreto (H.E. - 100X). **C** - Representação do tecido conjuntivo e fibras colágenas (T.G. - 100X) 27
- Figura 8 Doença periodontal moderada. **A** - Gengivite estabelecida com aumento e deformação do contorno marginal. **B** - Coleção de células inflamatórias na lâmina própria subjacente ao epitélio (H.E. - 100X). **C** - tecido conjuntivo infiltrado e reduzido (T.G. - 100X) 28
- Figura 9 Doença periodontal severa. **A** – Gengivite crônica com perda de inserção e retração tecidual. **B** – Destruição de células do epitélio gengival com redução na espessura total e infiltrado inflamatório crônico (H.E. - 100X). **C** – Aumento de espaços no tecido conjuntivo e perda de fibras colágenas (T.G. - 100X) 28
- Figura 10 Corte histológico evidenciando proliferação vascular contendo vasos de diferentes calibres, em seção transversal (seta) no tecido conjuntivo subjacente ao epitélio gengival. (H.E - 400X) 29

- Figura 11 Corte histológico de uma mesma amostra (A = segmento I; B = segmento III) evidenciando diferenças entre o grau de evolução do processo inflamatório (H.E. – 100X) 32
- Figura 12 Corte histológico evidenciando a presença concomitante de células mononucleares (seta preta) e polimorfonucleares (seta amarela) no tecido conjuntivo logo abaixo do epitélio gengival de cão. (T.G. - 1000X) 33
- Figura 13 Corte histológico de epitélio gengival demonstrando formação de espaços característicos da invasão de células inflamatórias e destruição de tecido conjuntivo com perda de fibras colágenas, levando a uma redução na espessura. Proliferação de células da camada basal (círculo) em resposta ao estímulo da agressão (T.G. – 400X) 34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Ilustração dos escores usados para quantificação do tecido conjuntivo de acordo com a sua substituição por infiltrado celular e vascular durante a progressão da inflamação	24
----------	---	----

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Representação do grau de correlação entre o número total de células do infiltrado com o número total de vasos entre segmentos das amostras totais 30
Gráfico 2	Representação do grau de correlação entre o número de células do infiltrado encontradas no SI com a espessura do epitélio em mm do SI 31
Gráfico 3	Representação do grau de correlação entre o número de células do infiltrado encontradas no SII com a espessura do epitélio em mm do SII 31
Gráfico 4	Representação do grau de correlação entre o número de células do infiltrado encontradas no SIII com a espessura do epitélio em mm do SIII 32
Gráfico 5	Representação do grau de correlação entre a concentração de fibras colágenas encontrados no SI com a espessura em mm do SI. A medida em que já diminuição das fibras colágenas há uma redução na espessura do epitélio 35
Gráfico 6	Representação do grau de correlação entre a concentração de fibras colágenas encontrados no SII com a espessura do epitélio em mm do SII 35

Gráfico 7	Representação do grau de correlação entre a concentração de fibras colágenas encontrados no SIII com a espessura do epitélio em mm do SIII	36
-----------	--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

IC	infiltrado celular
DP	doença periodontal
HV	hospital veterinário
mm	milímetros
µm	mocrômetros
N	número total de itens ou indivíduos da amostra
NCI	nível clínico de inserção
R ²	coeficiente de correlação estatística
HE	hematoxilina eosina
TG	tricromo de gomori
SI	segmento I
SII	segmento II
SIII	segmento III
SRD	sem raça definida
UFRPE	Universidade Federal Rural de Pernambuco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1 Exame Clínico Periodontal	17
2.2 Histologia do Epitélio Gengival	18
2.3 Doença Periodontal	18
3 OBJETIVOS	21
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
4.1 Animais	22
4.2 Exame Clínico Pormenorizado	22
4.3 Biópsias	23
4.4 Processamento histológico	24
4.5 Avaliação Histomorfométrica	25
4.6 Análise Estatística	26
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	37
7 CONCLUSÕES	38
REFERÊNCIAS	39

1 INTRODUÇÃO

As doenças bucais em cães foram relegadas, durante muito tempo, a assuntos de importância secundária dentro da prática clínica e cirúrgica de pequenos animais. Este cenário está mudando com o crescimento e modernização da Odontologia Veterinária e sua demanda já é uma realidade nos grandes centros urbanos, onde a atualização nos conhecimentos visando melhores cuidados com a saúde bucal de animais de estimação aumenta progressivamente entre criadores, proprietários preocupados com a posse responsável e também médicos veterinários atentos em acompanhar o progresso científico. A qualidade de vida e longevidade dos cães e gatos vem aumentando progressivamente na medida em que esforços com pesquisas e melhoria na qualidade dos serviços médicos são alcançados. Sem dúvida as alterações que mais acometem cães e gatos no mundo são aquelas relacionadas às estruturas periodontais, ou seja, que suportam e envolvem os dentes, e a principal delas é a doença periodontal, que ainda hoje, é a moléstia que mais freqüentemente se observa em cães e em gatos, conforme relato de diversos autores, dentre eles Harvey e Emily (1993), que há algumas décadas vêm alertando para este fato.

A doença periodontal é um problema de saúde pública, em virtude da grande concentração bacteriana em focos infecciosos na cavidade oral de cães domésticos, os quais têm contato muito próximo com seus donos. Microorganismos como *Escherichia coli*, *Proteus sp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, são freqüentemente isolados na cavidade oral de cães portadores de periodontite grave. Na maioria dos casos estas bactérias podem ganhar a corrente sanguínea causando comprometimento em outros órgãos levando a endocardites, glomerulonefrites, hepatopatias, artrites, uveítes, meningites, septicemia e morte do animal. Por isso, a importância de se detectar o estágio inicial da doença é fundamental para evitar sua progressão resultando em danos irreversíveis para o paciente. Nos estágios iniciais é possível adotar medidas de controle apropriadas que retardem ou impeçam o desenvolvimento do processo inflamatório. Recursos como avaliação clínica pormenorizada, histopatologia, radiografia e cultura microbiana não devem ser negligenciados pelo valioso auxílio no diagnóstico e classificação do grau da doença permitidos com estes exames.

A investigação periodontal não é sistematicamente praticada na Medicina Veterinária, não havendo dados atuais passíveis de exploração para os diferentes

graus e estágios das lesões periodontais nas várias espécies e raças estudadas. Destaca-se neste trabalho a preocupação no diagnóstico precoce da doença periodontal, sua ação no epitélio gengival de proteção, a necessidade de se estabelecer um diagnóstico histológica por meio de biópsia gengival simples, evitando a exodontia em certos casos para avaliação detalhada do epitélio juncional.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Exame Clínico Periodontal

A gengiva saudável é corada de rosa ou pigmentada, firme, resistente e com crista laminar ou lâmina própria. Anatomicamente a gengiva é dividida em marginal, ou livre e gengiva aderida (GIOSO, 2003). A superfície da gengiva marginal é voltada para o dente semelhante a um colarinho de camiseta formando o sulco da gengiva livre. A gengiva recobre o processo do osso alveolar da maxila e da mandíbula, circundando o dente, por isso funciona como periodonto de proteção (HARVEY; EMILY, 1993). A presença de bolsa periodontal pode ser evidenciada através da sondagem periodontal, que deve ser realizada de maneira gentil, paralela ao longo eixo do dente, circundando todas as suas faces. A profundidade da bolsa periodontal é medida em milímetros e é determinada pela mensuração da margem da gengiva livre até o epitélio de aderência da gengiva ao dente. A perda real de inserção do epitélio também chamada de nível clínico de inserção (NCI) é medida desde a junção amelo-cementária até o epitélio de aderência que interrompe a penetração da sonda no sulco gengival ou na bolsa periodontal. A sonda milimetrada permite que se faça mensuração precisa da extensão da migração do epitélio e, conseqüentemente, do tamanho da bolsa formada a partir da lesão (HANNET; HARVEY; 1991).

Clinicamente as formas de doença periodontal são caracterizadas por alterações na cor e na textura da gengiva, tais como, vermelhidão e exudato, como também um aumento na tendência ao sangramento à sondagem no sulco gengival / bolsa periodontal. Além do mais, os tecidos periodontais podem exibir uma redução na resistência à sondagem (aumento da profundidade clínica da bolsa) e / ou retração tecidual. Estágio mais avançados da doença são freqüentemente associados a um aumento na mobilidade dentária e como também presença de cálculo e mau hálito persistente (HARVEY, 1998).

2.2 Histologia do Epitélio Gengival

A gengiva é constituída por um epitélio pavimentoso estratificado queratinizado subdividido em *estrato basal*, formado por uma única camada de células que se apóia sobre a membrana basal; *estrato espinhoso*, composto de células unidas por pontes intercelulares (desmossomos) que dão a característica de espinhos e são a fonte do tecido. Estes dois estratos juntos formam o epitélio germinativo, responsável pela substituição das células descamadas na superfície luminal. O *estrato granuloso*, caracterizado pela presença de células com núcleos picnóticos e percussoras na produção de queratina; do *estrato lúcido* formado por camadas de células que estão morrendo ou mortas, de núcleos ausentes ou indefinidos; e, finalmente, na superfície o *estrato córneo* representado por células mortas densamente agrupadas em graus variáveis de queratinização (BANKS, 1992).

Em condições fisiológicas, circundando o istmo de cada dente e com cerca de 2 mm de profundidade em humanos e animais, o epitélio gengival é um pequeno conjunto de camadas de células finas (0,15 mm de espessura). Gengivas saudáveis normais apresentam um infiltrado de células inflamatórias, predominantemente neutrófilos associados ao epitélio juncional e linfócitos no tecido conjuntivo subjacente (PAGE; SCHROEDER, 1976).

2.3 Doença Periodontal

A doença periodontal é a causa mais comum de interação entre bactérias da placa e os componentes celulares da resposta imune humoral, incluindo citocinas e mediadores biológicos responsáveis pela ativação de células imunocompetentes (KORNMAN et al. 1997; PAGE et al. 1997). As células do infiltrado inflamatório (neutrófilos, linfócitos T e B, células do plasma e macrófagos) participam de um mecanismo específico na progressão da doença periodontal (PAGE et al. 1997). Embora o conhecimento a respeito das células envolvidas esteja aumentando (GEMMELL et al. 1997), pouco é sabido sobre a natureza precisa das interações celulares que contribuem para progressão da periodontite.

Em um corte histológico, a doença periodontal é caracterizada pela presença de infiltrado e células inflamatórias dentro de uma zona de 1 a 2 mm de largura no tecido conjuntivo gengival adjacente aos depósitos bacterianos na superfície do dente. Dentro da área do infiltrado existe uma avançada perda de fibras colágenas (LINDHE, 1999).

O processo destrutivo é desencadeado pelo acúmulo de placa bacteriana e seus componentes, próximo à gengiva e dentro do sulco gengival. Após um período de organização que varia de 24 a 48 horas, inicia-se inflamação dos tecidos envolvidos. Ao se organizar, a placa bacteriana cria um ambiente propício à proliferação de bactérias anaeróbias na boca. São esses organismos que, através do seu metabolismo, liberam toxinas com grande capacidade de invasão e destruição do tecido gengival adjacente (HARVEY; EMILY, 1993). À medida que o agente agressor mantém-se atuante, inicia-se resposta imunológica de caráter humoral, resultando em liberação de prostaglandinas e outros mediadores da inflamação, estimulação de osteoclastos e ativação de enzimas (proteases e colagenases), agravando a destruição das estruturas de sustentação do dente (PAGE; SCHRÖEDER, 1976; GIOSO, 2003).

Hennet e Harvey (1991) fizeram uma revisão a respeito dos organismos que compõem a placa bacteriana de cães e que são responsáveis diretos pelo processo de destruição do periodonto. Nos casos de periodontite, de 74 a 95% dos microorganismos que atuavam na doença eram anaeróbios. Destes, cerca de 30% eram *Bacteroides* pigmentados e quase 40% era composto de *Fusobacterium sp.*, além da presença de Espiroquetas. O mesmo trabalho mostrou que alguns organismos, principalmente o *Actinobacillus actinomicetencomitans*, apresentaram potencial imunossupressivo, através do qual conseguiu-se suprimir a resposta linfocitária do animal e degradar moléculas de IgA, o que contribuiu para a manutenção da doença.

Crescimento tanto no aumento da permeabilidade vascular quanto na neovascularização são condições patológicas típicas de crescimento tumoral ou inflamação crônica (MAEDA et al, 1998; NOR et al, 1999). Durante a progressão da doença periodontal, a vascularização do periodonto é profundamente afetada. Há evidências que o tecido inflamado realça a expressão dos mediadores da inflamação, que em sua volta podem promover a angiogênese (JOHNSON, 1998). O

Fator de Crescimento Vascular endotelial (VEGF) realça também a permeabilidade e a neovascularização, podendo-se relacionar-se este evento à doença periodontal.

Estudos demonstraram que os níveis elevados da atividade da colagenase no flúido crevicular gengival (GCF) estão associados com a degradação de tecidos periodontais na progressão da periodontite comparado com os tecidos periodontais saudáveis. A ativação das colagenases é um fator importante na progressão da periodontite. A dissolução de fibras de colágeno é uma parte integral da perda de suporte periodontal. A classificação da doença periodontal em várias categorias é baseada principalmente na progressão da doença e na susceptibilidade do animal em função da idade (HARVEY, 1998).

Fatores genéticos, fatores ambientais e fatores de risco dquiridos influenciam significativamente na resposta do hospedeiro aos desafios microbianos, gerando respostas diferentes com destruição das fibras colágenas, matriz extra-celular e óssea. A destruição do tecido conjuntivo é mais significante do que a própria perda óssea que pode até não estar presente, especialmente em alguns casos iniciais de periodontite juvenil.(LINDHE, 1999)

Estabelecer um prognóstico em cães portadores de doença periodontal, por meio da caracterização das condições histopatológicas prevalentes e

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar clínica e histopatologicamente as alterações, nos seus diferentes graus, sobre o epitélio gengival marginal de cães portadores de doença periodontal.

3.2 Específicos

- Descrever a composição estrutural dos tecidos gengivais nos diferentes graus do processo inflamatório.
- Estabelecer um prognóstico histopatológico em cães portadores de doença periodontal.
- Caracterizar as alterações clínicas e histopatológicas prevalentes na mucosa gengival de cães portadores de doença periodontal.

4.1 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

O estudo foi realizado em 21 cães adultos, entre machos e fêmeas, com ou sem raça definida, atendidos no Hospital Veterinário da UFRPE, Clínicas Veterinárias particulares do Recife (PE) e provenientes do Centro de Vigilância Ambiental (CVA) de Peixinhos, Olinda (PE). Os animais, acometidos naturalmente, foram selecionados em condição clínica de saúde bucal nos diferentes graus da doença periodontal. Não foi estabelecido critério de seleção quanto ao porte dos animais, peso ou raça em virtude do caráter de avaliação clínico-histológica do estudo.

4.2 Exame Clínico Pormenorizado

Com o animal sob anestesia geral inalatória (isoflurano) ou imediatamente após a eutanásia, no CVA, a cavidade oral foi examinada através sondagem periodontal circunferencial no sulco gengival (Figura 1) para avaliação do grau de comprometimento das estruturas afetadas, incluindo-se sangramento à sondagem e profundidade das bolsas periodontais. Com a definição do grau de doença periodontal, cada um deles foi fotografado e identificado em ficha odontológica para controle posterior.

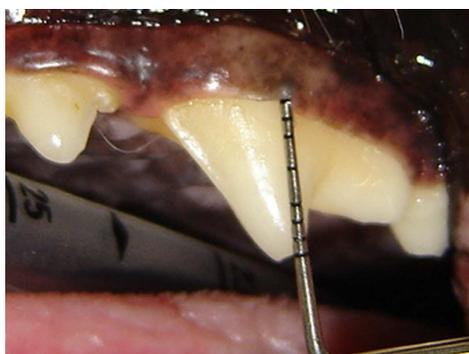


Figura 1. Imagem de exploração do sulco gengival com sonda milimetrada em

dente quarto pré-molar superior de ambos os lados de um cão.

4.3 Biopsias

As amostras gengivais foram coletadas por meio da técnica de gengivectomia (LINDHE, 2001) com uso de lâmina de bisturi nº 12. Uma biópsia, de aproximadamente 5 milímetros de comprimento por 1,5 milímetro de largura, foi executada na margem gengival vestibular do quarto pré-molar superior direito em cada paciente (Figuras 2 e 3). Logo após realização das coletas, os fragmentos foram identificados e fixados em solução de McDowell por um período de 30 dias (MCDOWELL; TRUMP, 1976).

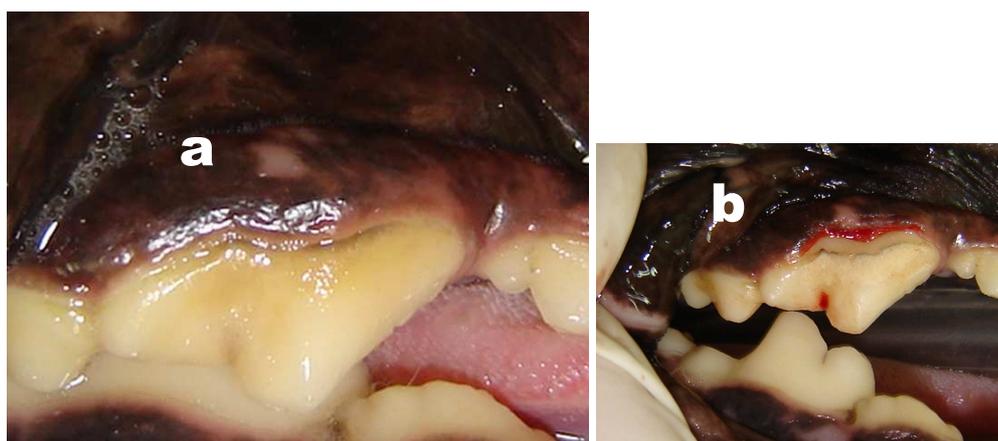


Figura 2. (a) Região vestibular de quarto pré-molar superior de cão e após a realização da biópsia (b).

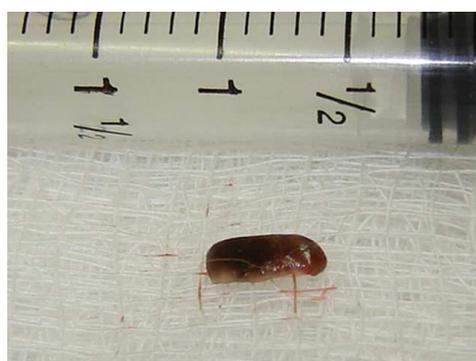


Figura 3. Detalhe do fragmento gengival biopsado da região vestibular do dente 4º pré-molar superior direito.

4.4 Processamento Histológico

Os fragmentos histológicos passaram por processamento usual para inclusão em parafina, em seqüência, obtiveram-se cortes em micrótomo automático (Leica, RM819) feitos com espessura de 3 μ m na região central das amostras a fim de se observar claramente a gengiva marginal do epitélio oral e o tecido conjuntivo, corados em Hematoxilina/Eosina e Tricromo de Gomori. Cada amostra foi subdividida em três segmentos seqüenciados: coronal (I), médio (II) e apical (III) (Figura 4).

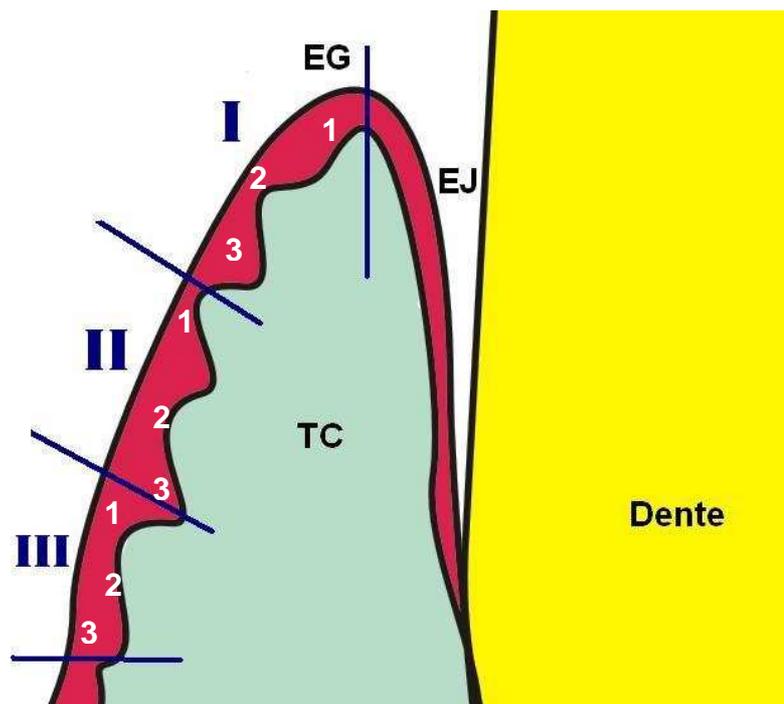


Figura 4. Ilustração esquemática de corte vestibulo-lingual da gengiva livre mostrando as áreas analisadas (1, 2 e 3) nos segmentos I, II e III. EG = epitélio gengival, EJ = Epitélio juncional, TC = Tecido conjuntivo (colágeno).

4.5 Avaliação Histomorfométrica

Cada segmento das preparações foram fotografadas sob um microscópio óptico, na objetiva de 10X e em seguida foram transformadas em imagens digitais com resolução de 4.1 mega pixels. As análises histomorfométricas foram executadas com o software ImageLab – Sistema de Processamento e Análise de Imagem (Softium informática LTDA - ME). Tomamos como referência a espessura do epitélio gengival constituído entre a distância da camada basal da menor papila conjuntiva e a superfície epitelial. Estas medidas foram expressas em milímetros (Figura 5). A leitura para contagem dos vasos sanguíneos, células mononucleares e polimorfonucleares foi realizada escolhendo-se três áreas aleatórias de cada segmento na objetiva de 100X.

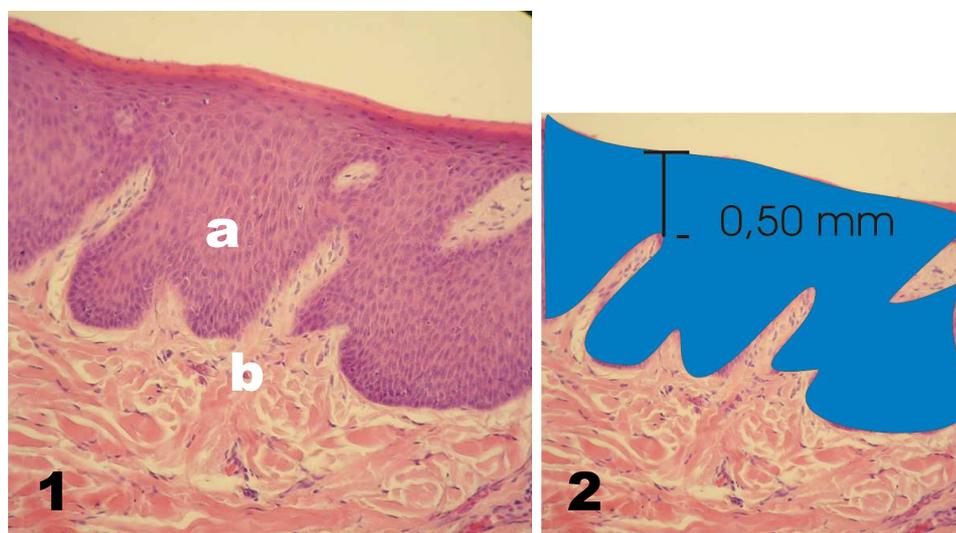


Figura 5. 1. (a) Fotomicrografia do epitélio gengival e corte transversal evidenciando seu conjuntivo que se intercala em forma de cristas conjuntivas (b). 2. Fotomicrografia do mesmo fragmento submetido à análise e processamento de imagem para determinação da espessura do epitélio (H.E – 100X).

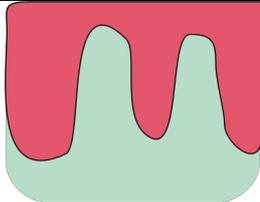
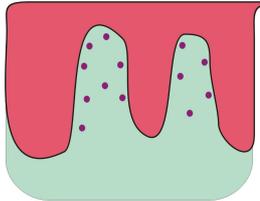
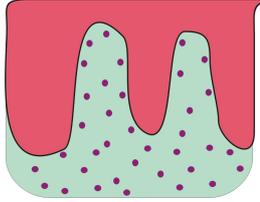
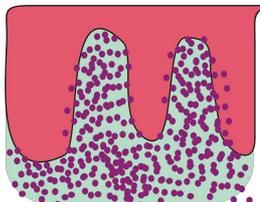
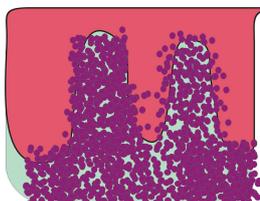
Normal	+	O tecido conjuntivo está sem alterações e o infiltrado celular é muito discreto.	
Inicial	++	O tecido conjuntivo já apresenta um pequeno número de células infiltradas	
Moderada	+++	A concentração celular do infiltrado é proporcional as fibras de colágeno (1:1). Início da formação de espaços no tecido conjuntivo.	
Avançada	++++	Escassez de fibras colágenas e infiltrado abundante. Espaços ou falhas no tecido conjuntivo são evidentes.	
Intensa	+++++	O tecido conjuntivo apresenta-se ausente em determinadas áreas.	

Tabela 1. Ilustração dos escores usados para quantificação do tecido conjuntivo de acordo com a sua substituição por infiltrado celular e vascular durante a progressão da inflamação.

4.6 Análise Estatística

As avaliações estatísticas foram feitas com o auxílio dos programas Minitab 13.0 e Microsoft Excel. Os testes da análise foram feitas através do coeficiente de correlação de Spearman (VANZOLINE, 1993).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com a metodologia empregada no presente estudo foi possível caracterizar clínica e histologicamente os diferentes graus da doença periodontal gengival de cães naturalmente acometidos.

A biópsia da gengiva marginal é considerada fácil de executar e não requer equipamentos sofisticados, ao contrário do epitélio juncional que, na maioria das vezes, é necessária a remoção de um bloco contendo elemento dentário e periodonto envolvidos a fim de se preservar todo o tecido para avaliação como mencionado por Matsson e Attstrom (1979). Todos os cortes dos materiais estão representados por gengiva marginal sendo esta, constituída de epitélio pavimentoso estratificado ortoqueratinizado cujo prolongamento constitui o epitélio interno em direção ao sulco gengival. A lâmina própria está representada por tecido conjuntivo (Figura 6).

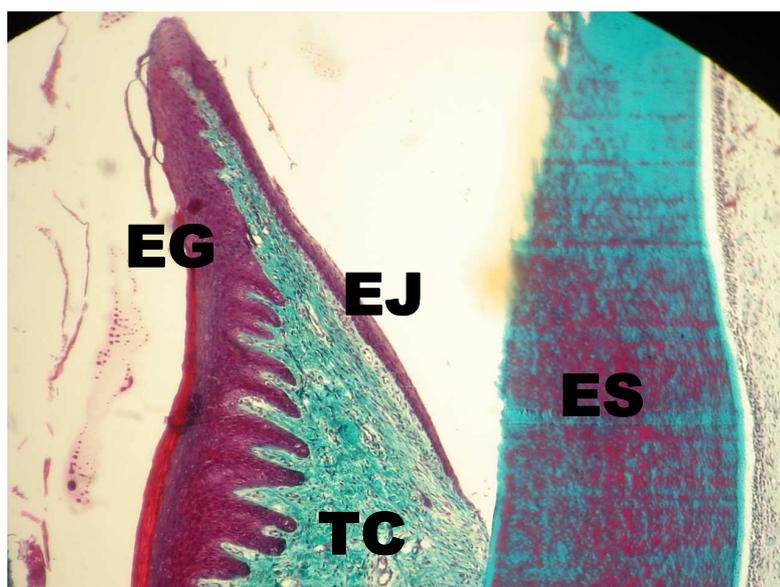


Figura 6. Corte vestibulo-lingual de uma gengiva normal de cão. O epitélio gengival (EG) funde-se com o epitélio juncional (EJ),

cobrindo a superfície do esmalte (ES). TC = tecido conjuntivo (T.G. – 100X).

A avaliação clínica gengival usada neste experimento baseou-se em Lindhe (1973 e 1999) quanto à caracterização pela coloração, consistência e sangramento à sondagem periodontal. Pois, segundo o mesmo, a gengivite representa um estágio inicial da doença periodontal já que esta é um dos componentes do periodonto, também composto de ligamento periodontal, cemento e osso alveolar. A doença periodontal pode ser classificada clinicamente em três graus: grau I - com sulco gengival normal sem presença de bolsa periodontal, mas apresentando sangramento gengival segundos após a sondagem; grau II – formação inicial de bolsa > 2mm, cálculo dental, edema e sangramento gengival imediatamente após a sondagem; grau III – presença de bolsas profundas > 4mm, a gengiva encontra-se retraída com destruição da linha mucogengival, sangramento espontâneo, podendo haver presença de cálculo dentário generalizado e halitose. Durante o exame clínico periodontal, à sondagem, dos 21 cães, cinco apresentavam grau I, dez grau II e os seis restantes com grau III. Embora clinicamente parte dos animais apresentasse sinais iniciais da doença, os resultados histológicos mostraram que o tecido conjuntivo apresentava claramente invasão de células inflamatórias caracterizando estágios avançados da lesão, concordando com Page e Schroeder (1976) que afirma que as alterações clínicas podem parecer sutis nos estágios iniciais da gengivite, entretanto, as alterações histopatológicas subjacentes já são bastante acentuadas (Figuras 10, 11 e 12)

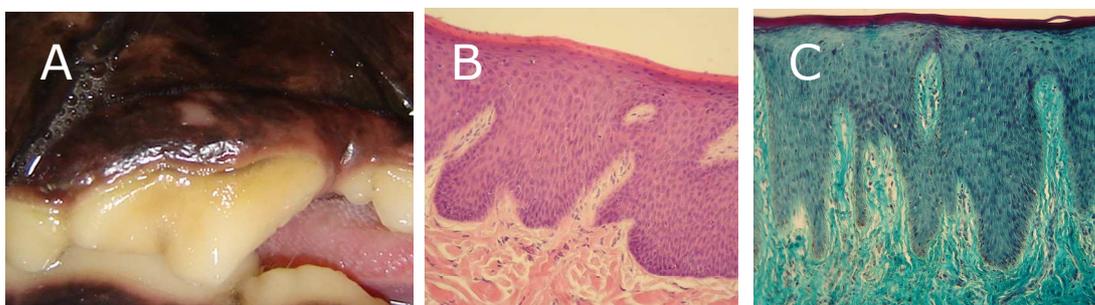


Figura 7. Doença periodontal inicial. **A** - Gengivite inicial apresentando tecido ainda preservado sem alterações clínicas significativas. **B** - Epitélio gengival bem próximo do

normal com camadas bem definidas e infiltrado celular discreto (H.E. - 100X). **C** - Representação do tecido conjuntivo papilar e reticular e fibras colágenas (T.G. - 100X).

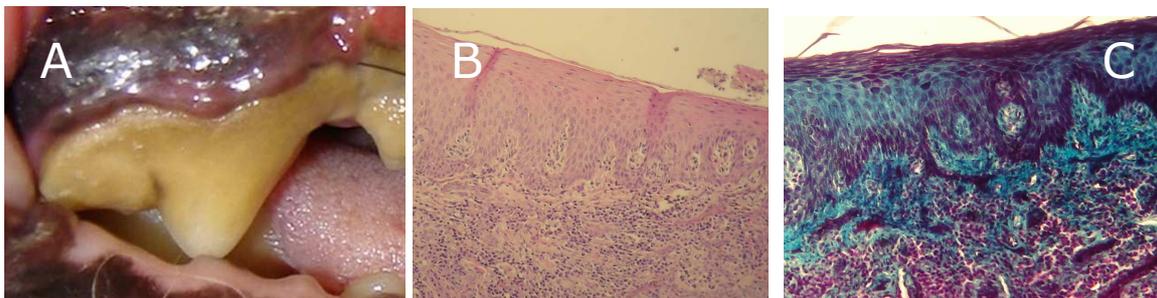


Figura 8. Doença periodontal moderada. **A** - Gingivite estabelecida com aumento e deformação do contorno marginal. **B** - Aglomerado de células inflamatórias na lâmina própria subjacente ao epitélio (H.E. - 100X). **C** - tecido conjuntivo papilar e reticular com infiltrado inflamatório diminuído (T.G. - 100X).

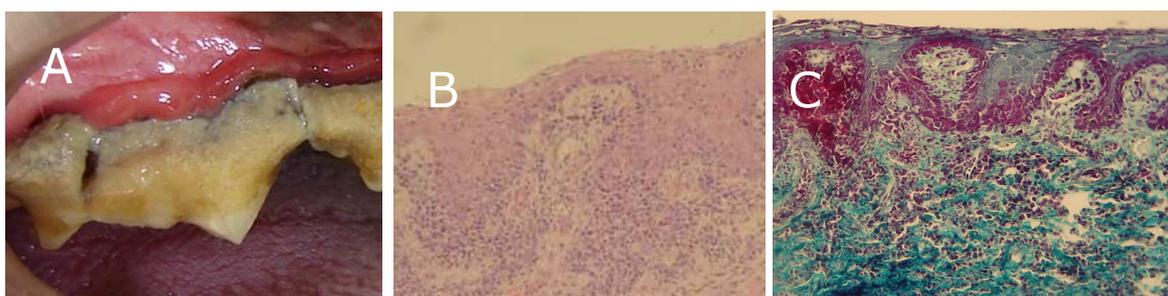


Figura 9. Doença periodontal severa. **A** - Gingivite crônica com perda de inserção e retração tecidual. **B** - Destruição de células do epitélio gengival com redução na espessura total e infiltrado inflamatório crônico (H.E. - 100X). **C** - Aumento de espaços no tecido conjuntivo e perda de fibras colágenas (T.G. - 100X).

Imediatamente abaixo do epitélio juncional há, segundo Lindhe (1999), alterações na rede vascular onde ocorrem a abertura de muitos capilares. Os fluidos e as proteínas exudativas causam a tumefação dos tecidos, ocorrendo um influxo de células inflamatórias no tecido conjuntivo subjacente ao epitélio juncional. Observamos um aumento significativo do número e calibre de vasos no tecido conjuntivo de acordo com a progressão da doença no segmento I (Figura 6). Acreditamos que essa diferença se deve ao fato do segmento I está mais próximo do sulco gengival e por conseqüência sofrer uma maior ação das toxinas liberadas pelas bactérias anaeróbicas no sulco gengival e epitélio juncional, com já descrito

por Harvey e Emily (1993). Supomos que a progressão da doença resulta na liberação de prostaglandinas e outros mediadores da inflamação e que levaram a um aumento do número de vasos em função da ativação das redes de capilares anteriormente inativos ou na angiogênese mais evidente neste segmento, realçado pela expressão dos resíduos da inflamação concordando com Egelberg (1967), Lindhe e Rylander (1975), Page e Schroeder (1976), Johnson (1998) e Gioso (2003). Este dado não foi evidenciado nos demais segmentos, mostrado este fato não está diretamente relacionado ao grau de desenvolvimento da doença nestas áreas.

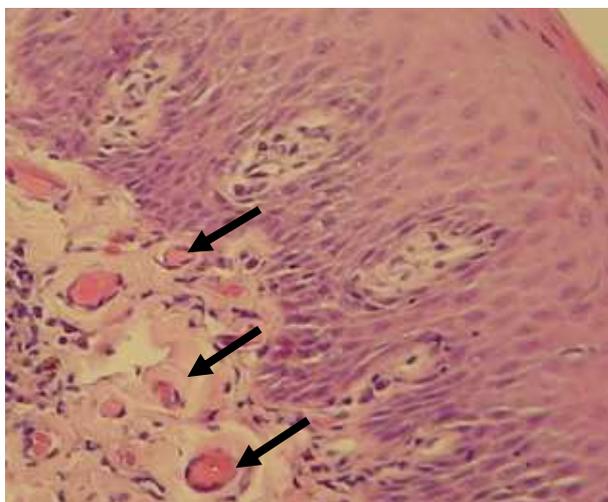


Figura 10. Corte histológico evidenciando proliferação vascular contendo vasos de diferentes calibres, em seção transversal (setas) no tecido conjuntivo subjacente ao epitélio gengival. (H.E. - 400X).

Nossos resultados demonstraram não haver correlação significativa ($R^2 = 24$) entre aumento da vascularização e número de células do infiltrado inflamatório no epitélio gengival nos três segmentos, não estando um fator dependente do outro (Gráfico 1). Este fato já foi evidenciado por Page e Schroeder (1976) quando afirmaram que mesmo em gengivas saudias ocorre infiltrado inflamatório, ou seja, as células precedem o surgimento da neovascularização.

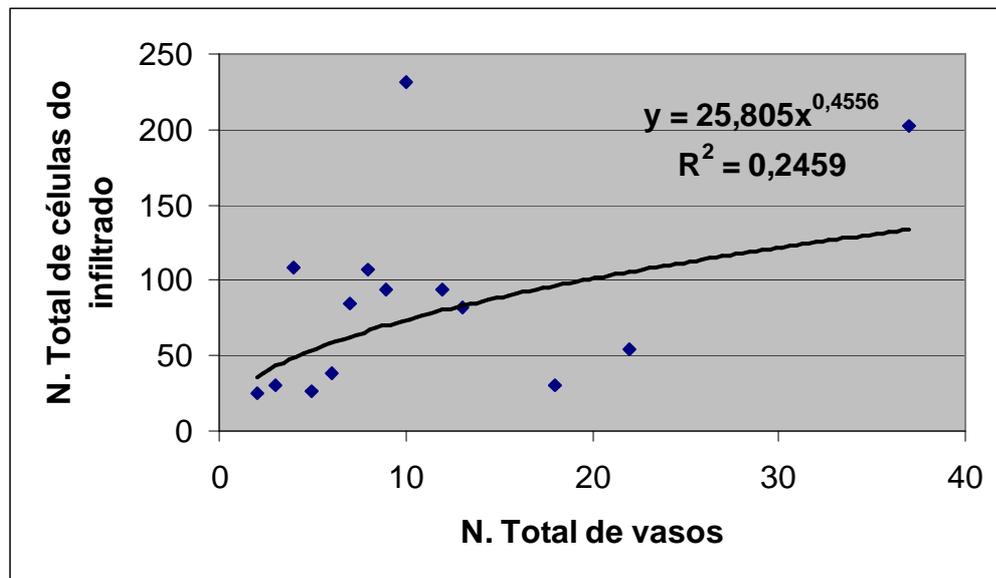


Gráfico 1– Representação do grau de correlação entre o número total de células do infiltrado com o número total de vasos entre os três segmentos das amostras.

Corroborando dos achados de Lindhe (1999), nossos resultados mostraram uma correlação significativa entre o aumento do número de células totais, entre mononucleares e polimorfonucleares, do infiltrado com a espessura do epitélio nos segmentos I, II e III (Gráficos 2, 3, 4 e Figura 11), obtendo-se uma maior significância no segmento III, onde quanto maior o número de células totais do infiltrado, menor a espessura do epitélio gengival.

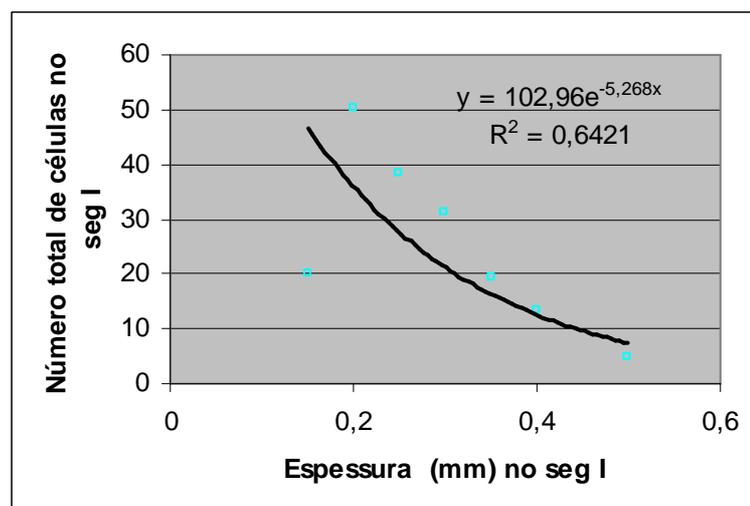


Gráfico 2 – Representação do grau de correlação entre o número de células do infiltrado encontrado no SI com a espessura do epitélio em mm do SI.

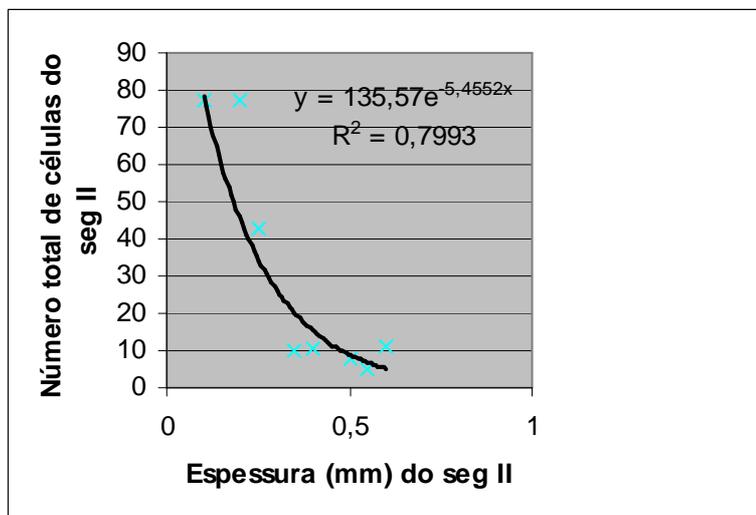


Gráfico 3 – Representação do grau de correlação entre o número de células do infiltrado encontrado no SII com a espessura do epitélio em mm do SII.

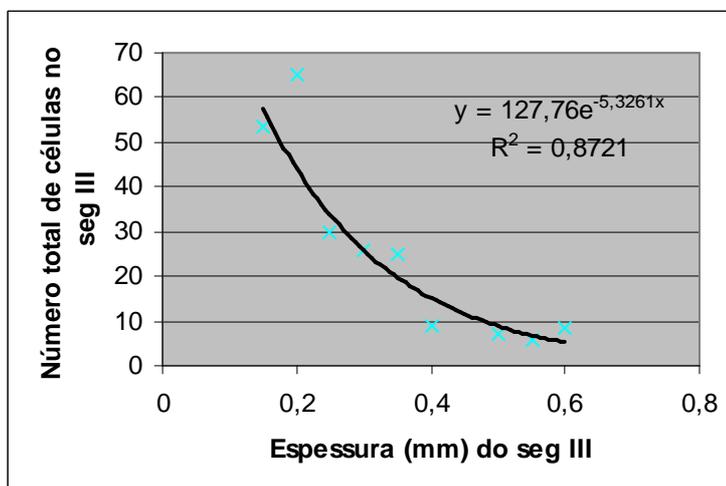


Gráfico 4 – Representação do grau de correlação entre o número de células do infiltrado encontrado no SIII com a espessura do epitélio em mm do SIII.

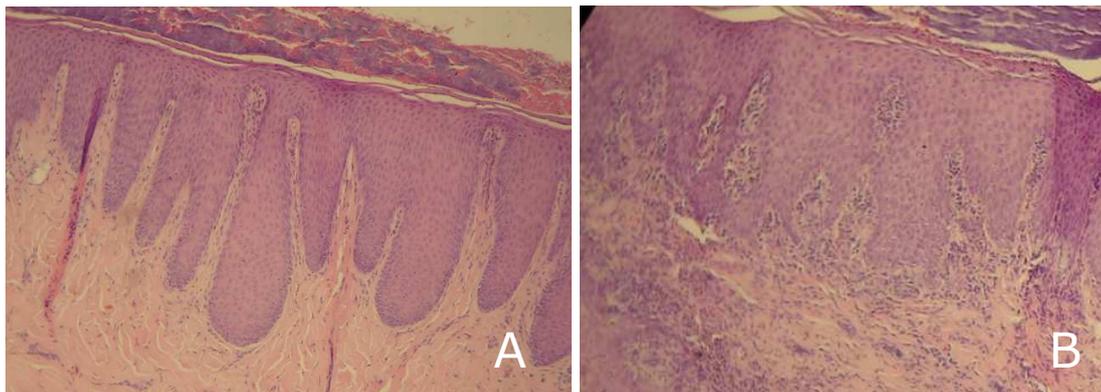


Figura 11. Corte histológico de uma mesma amostra (A = segmento II; B = segmento III) evidenciando diferenças entre o grau de evolução do processo inflamatório (H.E. - 100X).

As células basais do epitélio juncional e sulcular proliferam, representando uma tentativa do organismo de reforçar a barreira inata contra a placa. Cristas epiteliais podem ser vistas invadindo a porção coronária da lesão (SCHROEDER et al. 1975). Esta proliferação parece também ocorrer da mesma forma no epitélio gengival, onde foram constadas, mostrando desta forma que a resposta à agressão externa parece refletir também nas células do estrato basal do epitélio germinativo. Neste período, o epitélio dentogengival continua a proliferar e as cristas se prolongam no sentido do tecido conjuntivo, numa tentativa de manter a integridade epitelial e formar uma barreira contra a penetração microbiana (Figura 12).



Figura 12. Corte histológico evidenciando a presença concomitante de células mononucleares (seta preta) e polimorfonucleares (seta amarela) no tecido conjuntivo papilar, abaixo do epitélio gengival de cão. (T.G. - 1000X).

Um dos eventos mais importantes na patogênese da doença periodontal é a alteração dos constituintes do tecido conjuntivo em relação ao epitélio gengival, ou seja, à medida que o infiltrado celular se desenvolve, as composições estrutural e celular dos tecidos sofrem alterações. (PAGE; SCHROEDER, 1976; LINDHE, 1975). A relação entre fibras colágenas e a espessura do epitélio foi mais evidente no segmento I, onde quanto maior a perda de fibras colágenas menor a espessura do epitélio (Gráficos 5, 6 e 7). Segundo Page e Schroeder (1976), esta perda pode chegar até 70% do total de fibras colágenas presentes na área afetada, resultando em conseqüente decréscimo na produção de colágeno. Do mesmo modo, ocorre a destruição do colágeno na área infiltrada sendo isto necessário para que os tecidos possam ser empurrados, acomodando o infiltrado celular. Este processo poderia, portanto, ser considerado um processo de criação de espaço. A perda de colágeno continua a ocorrer nas direções lateral e apical, à medida que o infiltrado celular sofre expansão, resultando em espaços destituídos de colágeno que se estendem mais profundamente nos tecidos, os quais se encontram, então, disponíveis para a infiltração dos leucócitos (Figura 13).



Figura 13. Corte histológico de epitélio gengival demonstrando formação de espaços característicos da invasão de células inflamatórias e destruição de tecido conjuntivo papilar com perda de fibras colágenas subjacentes, levando a uma redução na espessura. Proliferação de células da camada basal (círculo) em resposta ao estímulo da agressão (T.G. - 200X).

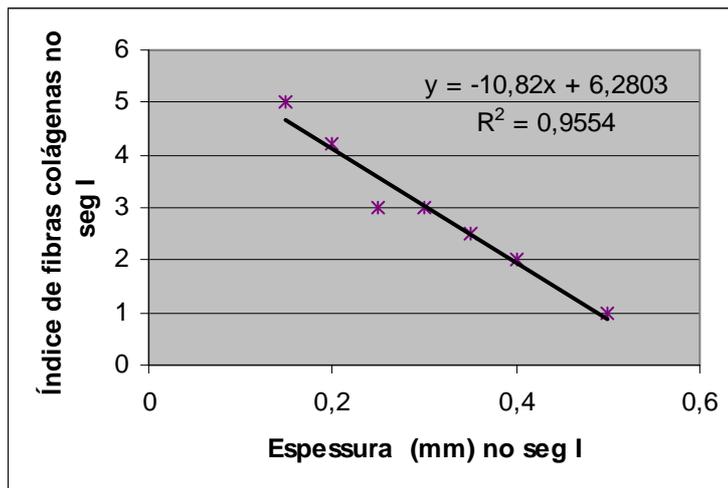


Gráfico 5 – Representação do grau de correlação entre a concentração de fibras colágenas encontrados no SI com a espessura do epitélio em mm do SI. A medida em que há diminuição das fibras colágenas há uma redução na espessura do epitélio.

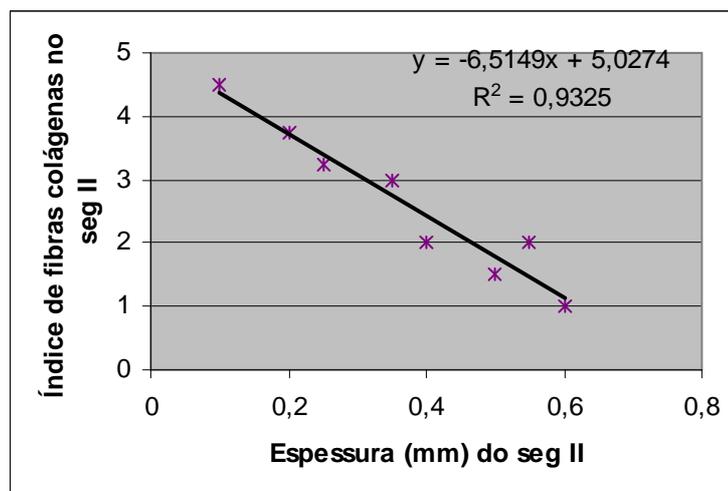


Gráfico 6 – Representação do grau de correlação entre a concentração de fibras colágenas encontrados no SII com a espessura do epitélio em mm do SII.

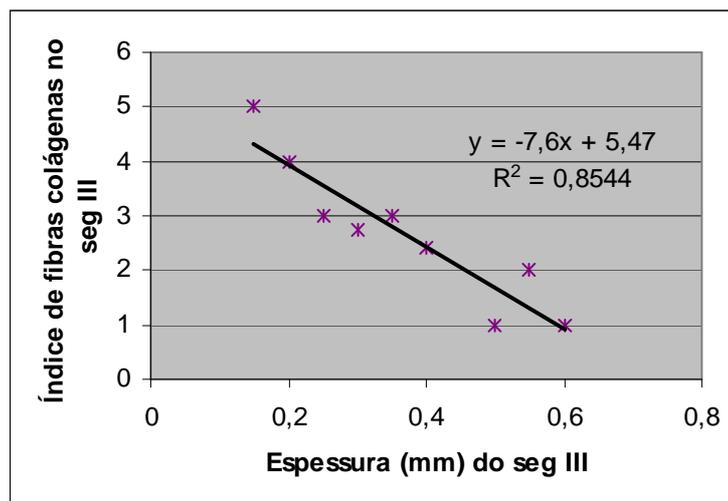


Gráfico 7 – Representação do grau de correlação entre a concentração de fibras colágenas encontrados no SIII com a espessura do epitélio em mm do SIII.

Em cães são necessárias apenas três a quatro semanas de acúmulo de placa para a formação de uma lesão ativa (PAYNE et al. 1975). Dois tipos de lesão estabelecida parecem existir. No primeiro, a lesão permanece estável e não progride por meses ou anos (LINDHE et al. 1975, PAGE et al. 1974); no segundo, a lesão se torna mais ativa e se transforma em lesão destrutiva progressiva. Estes dados podem ser observados em nosso estudo em segmentos diferentes de uma mesma amostra. Por isso, procuramos confrontar dados das correlações das variáveis dos três segmentos (I, II e III) entre si, procurando estabelecer inter-relações do processo inflamatório e sua progressão a fim de se promover diagnóstico precoce, ou mesmo, fornecer um prognóstico da progressão da lesão em cada segmento de cada amostra individualmente.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Sabemos que a doença periodontal pode persistir por muito tempo como lesão inicial e a variabilidade do tempo necessário para produzir uma lesão estabelecida pode refletir na variação da suscetibilidade no próprio indivíduo e entre indivíduos diferentes. Este trabalho reflete a importância de se implementar o diagnóstico histopatológico como mais um recurso no diagnóstico precoce da doença periodontal em cães. Para isso a importância de somar esforços no sentido de se pesquisar mais detalhadamente, promover uma classificação específica da evolução do processo inflamatório em seus diferentes graus em regiões de gengiva livre num mesmo animal, e também, em segmentos diferentes de uma mesma região gengival. Ressalta-se a necessidade de conscientização a respeito dos aspectos profiláticos da odontologia animal e do compromisso dos veterinários para com a profissão.

7 CONCLUSÕES

O estudo clínico de cães portadores de doença periodontal e a avaliação histopatológica do epitélio gengival permitiram concluir que:

A resposta clínica local, em muitos casos, não reflete a real condição evolutiva do infiltrado inflamatório no epitélio gengival de cães portadores de doença periodontal.

O número total de células do infiltrado-linfoplasmocitário tem coeficiente de correlação de $R= 0,24$ demonstrando que não há relação significativa com o aumento da vascularização local.

O percentual de tecido conjuntivo, representado por fibras colágenas, é diretamente proporcional à espessura do epitélio gengival em todos os segmentos.

De forma geral, o segmento I destaca-se como região de maior resposta ao processo inflamatório quando comparado ao segmento II e III.

As respostas à inflamação entre os segmentos diferem entre si sem relação de interdependência.

REFERÊNCIAS

- BANKS, W.J. **Histologia Veterinária**. São Paulo: Manole, 2 ed., 629p, 1991.
- EGELBERG, J. The topography and permeability of vessels at the dentogingival junction in dogs. **Journal of Periodontal Research**. N.20.v. 1. 1967.
- GARANT, P.R; MULVIHILL, J.E. The fine structure of gingivitis in the beagle. III. Plasma cell infiltration of the subepithelial connective tissue. **Journal of Periodontal Research**, 7, 161-172, 1972.
- GEMMELL, E.; MARSHALL, R. I.; SEYMOUR, G. J.; Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. **Periodontology** 2000 14:112–143, 1997.
- GIOSO, M.A. **Odontologia para o clínico de pequenos animais**. São Paulo, 5. ed., São Paulo, Ieditora, p. 202, 2003.
- HARVEY, C. E.; EMILY, P. P. **Small animal dentistry**. 1. ed. St. Louis: Ed. Mosby, p. 413, 1993.
- HARVEY, C. E. Periodontal disease in dog. Etiopathogenesis, prevalence and significance. **Veterinary Clinics North America - Small Animal Practice**, v. 28, n. 5, p. 1111-1128, Sept., 1998.
- HENNET, P. R.; HARVEY, C. E. Anaerobes in periodontal disease in the dog: a review. **Journal of Veterinary Dentistry**, v. 8, n. 2, p. 18-21, Jun, 1991.
- JOHNSON RB, SERIO FG, DAI X. Vascular endothelial growth factor and progression of periodontal disease. **J Periodontol** 70: 848–852, 1998.
- KORNMAN, K. S.; PAGE, R. C.; TONETTI, M. The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. **Periodontology** 14:33–53, 1997.

LINDHE, J.; RYLANDER, H. Experimental gingivitis in young dogs. **Scandinavian Journal of Dental Research**, n.83, p. 314-326, 1975.

LINDHE, J. et al. Plaque-induced periodontal disease in beagle dogs. A 4-year clinical, roentgenographical and histometric study. **Journal of Periodontal Research**, 10, 243-255, 1975.

LINDHE, J. **Tratado de periodontia clínica e implantologia oral**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 127-152, 1999.

MATSSON L.; ATTSTROM, R. Histologic characteristics of experimental gingivitis in the juvenile and adult beagle dog. **Journal of Clinical Periodontology**, 6: 334-350, 1979.

MAEDA T, MATSUMURA S, HIRANUMA H *et al.* Expression of vascular endothelial growth factor in human oral squamous cell carcinoma: its association with tumor progression and p53 gene status. **J Clin Pathol** 51: 771–775, 1998.

MACDOWELL, E.M.; TRUMP, B.F. Histologic fixatives suitable for diagnostic light and electron microscopy. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, v.100, p.405-414, 1976.

NÖR JE, CHRISTENSEN J, MOONEY DJ, POLVERINI PJ. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis is associated with enhanced endothelial cell survival and induction of Bcl-2 expression. **Am J Pathol** 154: 375–384, 1999.

PAGE, R. C.; OFFENBACHER, S.; SCHROEDER, H. E.; SEYMOUR, G. J.; KORNMAN, K. S. Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. **Periodontology** 14:216–248, 1997.

PAGE, R. C.; SCHRÖEDER, H. E. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current works. **Laboratory investigation**, v. 34, n. 3, p. 235–249, Mar. 1976.

PAGE, R. C. ; SIMPSON, D. M. ; AMMONS, W. F. Host tissue response in chronic inflammatory periodontal disease. IV. The periodontal and dental status of a group of aged apes. **Journal of Periodontology**, 46, 144-155, 1975.

PAGE, R. C.; SCHROEDER, H. E. **Periodontitis in man and animals. A comparative review**. New York: Karger, p.127-158, 1982.

PAYNE, W. A.; PAGE, R. C. ; OGILVIE, A. L. ; HALL, W. B. Histopathologic features of the initial and early stages of experimental gingivitis in man. **Journal of Periodontal Research**, 10, 51-64, 1975.

SCHROEDER, H.E.; BEER GRAF-DE, M.; ATTSTROM, R. Initial gingivitis in dogs. **J. Periodontal Res.** 10: 128-142, 1975.

VANZOLINI, P.E. **Métodos estatísticos elementares em sistemática zoológica**. Ed. Hucitec: São Paulo. 130p. 1992.