

Estudo Comparativo da Morfologia da Polpa Dentária de Dentes Humanos Submetidos à Técnica de Clivagem e a Técnicas de Descalcificação Química.

Comparative Study Of Dental Pulp Morphology From Human Teeth Submitted To Cutting Technique Or Chemistry Decalcification Technique.

BERNARDI, Lisiane*

BENTO, Letícia Westphalen**

MATTUELLA, Leticia Grandó***

ARAUJO, Fernando Borba de****

FOSSATI, Anna Christina Medeiros*****



RESUMO

Os rápidos avanços do conhecimento acerca do reparo e regeneração tecidual, têm despertado o interesse pela biologia pulpar. Entretanto, para avaliar microscopicamente a dinâmica do tecido pulpar, é necessário, inicialmente, que o dente seja submetido aos processamentos histológicos de fixação e descalcificação. A descalcificação pode afetar o grau de coloração e pode causar desnaturação de proteínas. Além disso, é um processo demorado, visto que o dente requer um longo período de desmineralização. Assim, a proposta deste trabalho foi de avaliar qualitativamente a matriz extracelular e as células da polpa dentária, comparando três grupos: dois em que o tecido dentário foi descalcificado e um em que a polpa foi removida dos tecidos duros, não necessitando do processo de descalcificação. Dez pré-molares foram fixados em formalina tamponada a 10% por 24 horas. Após, estes dentes foram divididos em três grupos: 4 dentes foram submetidos a processo de descalcificação por meio de solução de Morse, 3 por meio de solução de EDTA a 10% e; os 3 dentes restantes tiveram sua polpa separada dos tecidos duros dentários por meio da técnica de clivagem. Na seqüência, os três grupos foram processados por meio da técnica histológica de rotina e foram corados com H/E. Os resultados desta análise demonstraram que houve uma melhor conservação tanto da matriz extracelular, quanto das estruturas celulares no grupo da clivagem, seguido do grupo Morse e por fim, com a menor conservação das estruturas pelo grupo EDTA.

PALAVRAS-CHAVE:

Técnica de descalcificação. Polpa dentária. Processamento histológico. Morfologia pulpar. Introdução e Revisão de Literatura

Com a evolução nas últimas décadas da tecnologia de Bioengenharia de Tecidos, faz-se cada vez mais interessante e necessário à ciência odontológica, o conhecimento da dinâmica da biologia pulpar. Este interesse deve-se ao fato de o tecido pulpar não funcionar apenas como fornecedor de proteínas e de propriedades sensoriais para a dentina, mas também por ser a ele atribuída a capacidade de regeneração dentinária (GOLDBERG; SMITH, 2004; TSUKAMOTO-TANAKA et al, 2006). Para a compreensão deste processo e o esclarecimento da funcionalidade do tecido pulpar por completo, é preciso analisar as sinalizações e expressão de fatores de crescimento nele envolvidos. Assim, para esta avaliação, a polpa deve passar por processamentos histológicos e várias técnicas laboratoriais.

No entanto, cada estágio da técnica histológica de rotina empregada, como fixação, de-

sidratação, imersão, seccionamento e seqüência da coloração final podem induzir artefatos de distorções na célula e na arquitetura do tecido (HEATH; YOUNG, 2000). Como exemplo, o procedimento de descalcificação, etapa necessária para o processamento de tecidos duros, pode causar alterações nas estruturas dentárias, tais como esmalte, dentina e polpa. A descalcificação ou desmineralização de espécimes é encarregada de amolecer os tecidos duros, através da remoção dos cristais de hidroxiapatita, para possibilitar a inclusão e posterior secção ou da parafina ou do plástico. Estes cortes podem então, ser analisados microscopicamente (TINLING; GIBERSON; KULLAR, 2004).

A descalcificação pode causar desnaturação de proteínas e com isso, promover uma redução na atividade enzimática e na imunoreatividade, podendo até mesmo afetar o grau

de coloração, a perda e deslocamento do material dos sítios originais (HOSOYA et al, 2005). Além disso, a descalcificação é uma etapa demorada que exige a substituição sistemática das soluções empregadas (RODE; FARIA; MONTEIRO, 1996; PAGE, 1996). Essas soluções podem ser compostas de ácidos, como solução de ácido nítrico e a solução de Anna Morse e compostas de quelantes como o ácido etileno diamino tetracético (EDTA) (MORSE, 1945; KIERNAN, 1999; RODE; FARIA; MONTEIRO, 1996; TINLING; GIBERSON; KULLAR, 2004). Outro fator negativo em relação à necessidade de descalcificação do esmalte e dentina, segundo Morse (1945) é de que uma rápida fixação de todos os elementos dentários é difícil de ser obtida, visto que a penetração do agente fixador através de estruturas como esmalte, dentina e osso é um processo lento. Nestes casos, algumas alterações podem ocorrer.

* Cirurgiã-dentista pela FO.UFRGS. Rua Ramiro Barcelos, 2491/62. Bairro Rio Branco. Cep: 90035-007. Porto Alegre, RS. E-mail: blisiane@yahoo.com.br

** Especialista e Mestranda em Odontopediatria pela FO.UFRGS

*** Mestre em Odontopediatria pela FO.UFRGS

**** Mestre e Doutor em Odontopediatria pela FO.USP. Coordenador do Curso de Especialização em Odontopediatria da FO.UFRGS. Professor Adjunto da Disciplina de Odontopediatria da FO.UFRGS.

***** Mestre em Odontopediatria pela FO.USP. Doutora em Biologia Celular e Tecidual pelo ICB.USP. Professora Adjunta das Disciplinas Seminário de Integração I e II e Biologia dos Tecidos Buciais.

rer no tecido localizado no centro da amostra, antes que a fixação seja obtida. Provavelmente, o tecido mais seriamente afetado seria a polpa dental.

A polpa dental é um tecido conjuntivo frouxo especializado originado a partir das células da papila dental do órgão do esmalte. Uma vez completa a formação do dente, a polpa estará completamente circundada por um ambiente mineralizado (ARANA; KATCHBURIAN, 1999; BERKOVITZ; HOLLAND; MOXHAM, 2004; GOLDBERG; SMITH, 2004). A polpa adulta contém células que são responsáveis pela formação e *turnover* da sua matriz extracelular (MEC), sendo que a maioria das células são fibroblastos, mas são também observados macrófagos e estruturas como nervos e capilares. A MEC é composta por uma porção fibrosa colagenosa, e por uma matriz não fibrosa, onde estão presentes glicosaminoglicanas, proteoglicanas e moléculas de adesão. Quanto à parte celular, são identificadas células de defesa, mesmo em polpa saudável, incluindo células dentríticas, histiócitos e uns poucos linfócitos e células formadoras de dentina, os odontoblastos (BERKOVITZ; HOLLAND; MOXHAM, 2004; GOLDBERG; SMITH, 2004). Na camada subodontoblástica, pesquisas recentes têm identificado uma população de células mesenquimais indiferenciadas, com capacidade de auto-renovação, de diferenciação em múltiplas linhagens e com potencial clonogênico (GRONTHOS et al, 2000; GRONTHOS et al, 2003; MASAKO et al, 2003; BATOULI et al, 2003). A evidência da existência destas células pluripotentes tem despertado o interesse pelo estudo da polpa dentária.

Assim, para amenizar os artefatos produzidos na polpa, decorridos da descalcificação da estrutura dentária, se tem buscado novos protocolos de processamento, como o uso de energia de microondas associado ao EDTA e a separação da polpa por meio de clivagem (RODE; FARIA; MONTEIRO, 1996; PENNA; RODE, 2000). O uso da técnica de clivagem do dente visa à remoção prévia da polpa, eliminando, portanto, a etapa de descalcificação dos tecidos duros dentários. O objetivo deste trabalho foi avaliar qualitativamente, utilizando a técnica histológica de hematoxilina e eosina (H/E), a preservação das estruturas da polpa dentária de três grupos de dentes. Dois grupos onde se utilizou a descalcificação química das estruturas mineralizadas por soluções de Anna Morse ou EDTA e um grupo sem descalcificação, em que os dentes foram clivados.

MATERIAIS E MÉTODOS

A amostra deste trabalho foi proveniente de arquivo do laboratório de Biologia Bucal da FO.UFRGS. Fez parte do trabalho intitulado "Estudo da expressão do VEGFR2 em

polpas humanas de dentes permanentes hígidos", aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde.

Foram utilizados 10 pré-molares hígidos, coletados na Disciplina de Odontopediatria da FO.UFRGS, extraídos por razões ortodônticas mediante solicitação, por escrito, do ortodontista responsável pelo tratamento da criança. Todos os dentes foram fixados em formalina tamponada a 10% por 24 horas. Seguida a fixação, 3 dentes foram submetidos ao processo de descalcificação em EDTA a 10% e 4 em solução de Anna Morse. O processo de descalcificação foi realizado até o momento em que as peças tivessem uma consistência macia ao corte (aspecto borrachóide), o que ocorreu em cerca de 8 meses para os dentes do grupo EDTA e em média de 5 meses para os do grupo Anna Morse. As amostras imersas em EDTA foram agitadas aproximadamente 12 horas por dia, com o auxílio de um agitador magnético. Em ambos os casos, as soluções foram renovadas duas vezes por semana. Seqüencialmente à lavagem em água corrente por 12 horas, os espécimes foram submetidos a trocas crescentes de álcoois, diafanizados em xilol, submersos em parafina líquida e, posteriormente, incluídos em parafina fundida. Em cada um dos 3 dentes restantes, após as 24 horas de fixação, foi realizada a técnica de clivagem. Para tanto, foram preparadas três canaletas, utilizando-se peça de mão de alta rotação, sob refrigeração. Destas canaletas, duas foram paralelas ao longo eixo do dente, sendo uma na face vestibular e uma na face lingual, abrangendo toda a extensão da coroa até atingir a junção amelocementária. A terceira canaleta foi feita transversalmente à coroa, de forma a unir as outras duas longitudinais. A profundidade das canaletas foi determinada pelo aparecimento de tecido dentinário. Os dentes foram apreendidos com auxílio de um alicate 121 pela região radicular e clivados com o auxílio de um discoide cleoide e de uma enxada apical. Após a clivagem, estes dentes tiveram sua polpa separada cuidadosamente do tecido dentário por uma colher de dentina, e após seguirem seqüencialmente os processo de preparo para a inclusão em parafina, secção e coloração de igual maneira aos dentes descalcificados. Obtiveram-se cortes seriados de 5 mm de espessura a partir das amostras embocadas, com o auxílio de um micrótomo rotatório. Os mesmos foram coletados em lâminas histológicas e posteriormente corados com H/E. A morfologia das células e da MEC dos três grupos foi avaliada qualitativamente, por dois examinadores treinados.

RESULTADOS

Todos os grupos permitiram a coloração por H/E, no entanto esta foi mais evidente nos grupos da clivagem e no descalcificado com Anna Morse. No grupo em que foi utilizado o EDTA, verificou-se uma menor afinidade tintorial.

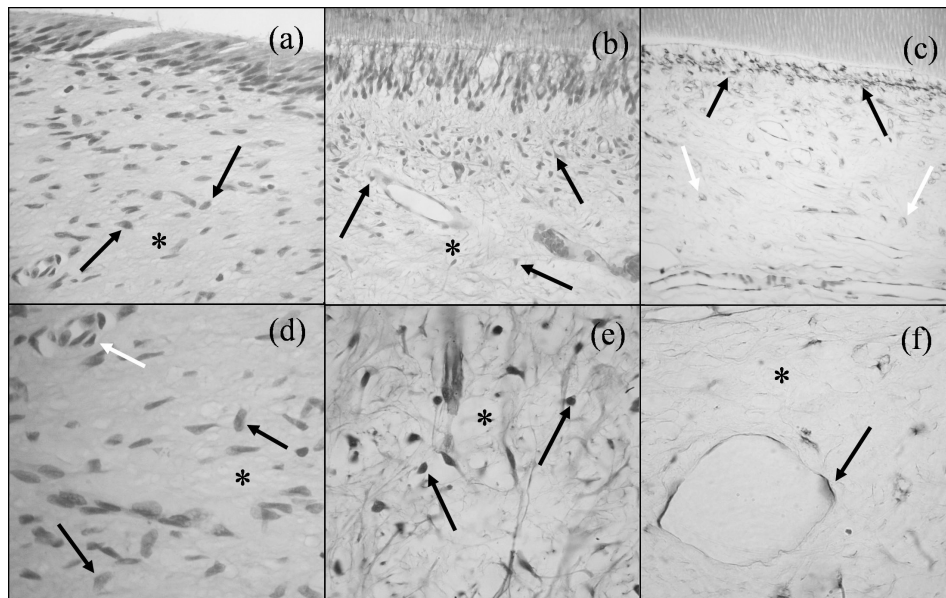
A MEC da polpa proveniente do dente submetido à clivagem foi a que apresentou maior integridade, com um aspecto mais homogêneo, enquanto que a do grupo EDTA teve a menor conservação, chegando a apresentar um aspecto mixomatoso (fig. 1a,d; fig. 1c,f respectivamente). Resultado semelhante foi observado quanto à morfologia celular. As células do grupo de EDTA não preservaram sua morfologia e, sendo assim, nem sempre possibilitaram a definição de seu fenótipo. Ainda, alguns dos seus núcleos apresentaram-se picnóticos, enquanto outros apresentaram aspecto vacuolar (fig. 1c,f). As células do grupo Anna Morse, apesar de estarem mais bem conservadas que as do EDTA, apresentaram núcleos reduzidos, com formato alongado e não bem delimitados (fig. 1b,c,e,f). O grupo em que o dente foi clivado evidenciou a melhor manutenção da morfologia celular. Suas células continham núcleos bem definidos e evidentes, podendo ser observada uma granulação suave no seu interior. A preservação estrutural obtida permitiu que vários tipos celulares fossem identificados, tais como macrófagos, linfócitos e fibroblastos (fig. 1a,d).

Em todos os grupos foi possível identificar a existência de nervos e vasos, sendo que as células endoteliais foram mais bem identificadas no grupo clivado (fig. 1d). O Anna Morse foi o que demonstrou melhor conservação da topografia normal da polpa, podendo ser definidas a camada rica em células, a zona acelar e a camada odontoblástica (fig. 1b). Já no grupo clivado, os odontoblastos nem sempre estiveram presentes em toda a extensão pulpar.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A remoção dos cristais de hidroxipatita, constituintes dos tecidos mineralizados que circundam a polpa dentária, é essencial para o preparo histológico, que permitirá a análise detalhada da estrutura normal ou patológica do órgão pulpar. Atualmente, recorre-se à aplicação de substâncias químicas que atuam sobre a estrutura dentária, promovendo a desmineralização dos tecidos duros do dente. O principal objetivo destas substâncias é tornar os tecidos dentários capazes de serem reduzidos a espessuras micrométricas e então serem observados sob microscopia de luz. Esta condição deve ser alcançada com um mínimo de alteração da estrutura tecidual. Em vista deste propósito, estratégias têm sido propostas com a finali-

Figura 1 - Fotomicrografia em H/E de dentes pré-molares, submetidos à clivagem de seus tecidos mineralizados (a,d), submetidos à descalcificação com solução de Anna Morse (b,e) e submetidos à descalcificação por EDTA (c,f). Em (a), visualiza-se a MEC compacta (*) e células com núcleos definidos (setas); d) maior aumento da região anterior: observa-se vaso neoformado (seta branca); presença de granulações suaves no interior dos núcleos (setas pretas); MEC (*); b) observa-se a manutenção da topografia pulpar. A MEC está menos compacta (*), contendo células com núcleos não bem definidos (setas); e) maior aumento da região anterior, permitindo melhor visualização da MEC (*), bem como a observação da redução do tamanho celular (setas); c) são vistas alterações na MEC e algumas células apresentam núcleos picnóticos (setas pretas) e vacuolizados (setas brancas); f) no maior aumento as células aparecem com núcleos mais indefinidos (seta) e evidencia-se o aspecto mixomatoso da MEC (*). Aumento de 400x (a-c) e de 1000x (d-f). Zoom 1.4



dade de capacitar os pesquisadores a analisar estes tecidos, bem como as estruturas a eles relacionadas, sem submetê-los a processos longos químicos de descalcificação (HOSOYA et al, 2005).

O presente estudo mostrou que a melhor conservação tecidual foi obtida com o uso da clivagem dentária. O uso do EDTA causou uma profunda alteração da MEC, bem como dos diversos tipos celulares. Esta condição observada está em desacordo com os resultados obtidos por Vier-Pelisser (2005) em seu trabalho, quando utilizou o EDTA como meio descalcificador, obtendo ótimos resultados. Esta diferença de resultados se deve provavelmente à natureza do material utilizado. O autor utilizou em seu trabalho estruturas mineralizadas provenientes de roedores, quando o tempo utilizado para desmineralização foi de poucos dias. No atual estudo, em que foram utilizados dentes humanos, o tempo para descalcificação das estruturas dentárias, em alguns casos, atingiu 10 meses. O tempo transcorrido no qual as estruturas ficaram sujeitas às soluções químicas pareceu ser crítico para a conservação tecidual. Este aspecto foi confirmado pela MEC da polpa do grupo não submetido à ação química. Esta se apre-

sentou mais homogênea do que as demais, com seus tipos celulares e núcleos bem destacados. A conservação tecidual foi superior aos outros dois grupos, permitindo uma observação mais detalhada dos diversos elementos. Em contrapartida, a remoção da polpa determinou como inconveniente a perda da relação espacial do tecido, já que toda estrutura que a circunda foi eliminada. A camada de odontoblastos apresentou-se, às vezes, distorcida e, em algumas regiões, ausente. Observou-se, ao mesmo tempo, que houve uma perda na topografia pulpar habitual, o que pode representar um empecilho para alguns tipos de pesquisa. O tecido pulpar dos dentes em que a solução de Anna Morse foi empregada como agente descalcificador, mostrou-se mais íntegro do que aquele submetido ao EDTA, porém, mais alterado do que aquele obtido pela clivagem dentária. Mais uma vez, o tempo despendido nas descalcificações parece ter influenciado. Apesar da evidência da qualidade tecidual ser inferior em relação àquela obtida quando da remoção direta, verificou-se que a topografia habitual do órgão pulpar foi mantida.

Nas condições observadas neste estudo, pode-se concluir que no processo de análi-

se da polpa dentária de dentes humanos pela técnica de H/E, a clivagem da peça dentária parece ser a que menos alteração determina à integridade do órgão. No entanto, há necessidade de mais estudos laboratoriais que venham a utilizar outros tipos de procedimentos, para então confirmar os resultados obtidos. Faz-se importante ressaltar que previamente à escolha do procedimento a ser empregado, para a análise do órgão pulpar, a estrutura a ser analisada deve ser bem determinada, a fim de que a técnica mais apropriada seja selecionada.

ABSTRACT

The rapid advances of the knowledge of repair and regeneration tissues had proved to be an exciting time for pulp biology. However, to study the dynamic of pulp tissue, it is necessary, initially, that the tooth be submitted to histological fixation and decalcification processing. Decalcification may affect the degree of staining and it may cause denaturation of proteins. Furthermore, it is a slow process, demanding long demineralization times for a tooth. Thus, the purpose of the present study was to compare, qualitatively, the pulp extracellular matrix and the pulp cells, submitted to different techniques: EDTA solution decalcification, Anna Morse solution decalcification and a last group which pulp was removed from tooth without decalcification. Ten premolar teeth were fixed in 10% buffered formalin for 24 hours. After this, the teeth were divided in three groups: 4 teeth underwent decalcification with Morse solution; 3, decalcification with 10% EDTA solution and; 3, were sectioned and their pulps were gently removed. Subsequently, the groups followed the routine histological technique and staining with H/E. The results demonstrated that both conservation of pulp cells and extracellular matrix were better in the group without decalcification, followed by the Morse group and, the last, with the worst structures conservation for the EDTA group.

KEYWORDS

Decalcification technique. Dental pulp. Histological processing. Pulp morphology.

REFERÊNCIAS

- ARANA, V; KATCHBURIAN, E. Complexo Dentina-Polpa. In: _____. **Histologia e Embriologia Oral: Texto – Atlas – Correlações Clínicas.** São Paulo: Panamericana, 1999. P. 181-236.
- BATOULI, S. et al. Comparison of Stem-Cell-Mediated Osteogenesis and Dentinogenesis. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v. 82, no.12, p. 976-981, Dec. 2003.

- BERKOVITZ, B.K.B.; HOLLAND, G.R.; MOXHAM, B.J. Polpa Dentária. In: _____. **Anatomia, Embriologia e Histologia Bucal**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. P. 149-167.
- GOLDBERG, M.; SMITH, A. Cells and Extracellular Matrices of Dentin and Pulp: A Biological Basis for Repair and Tissue Engineering. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, Alexandria, v. 15, no. 1, p. 13-27, Jan. 2004.
- GRONTHOS, S. et al. Postnatal Human Stem Cells (DPSCs) *In Vitro* and *In Vivo*. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 97, no. 25, p. 13625-13630, Dec. 2000.
- GRONTHOS, S. et al. Stem Cell Properties of Human Dental Pulp Stem Cells. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v. 81, no. 8, p. 531-535, Aug. 2002.
- HEATH, J. W.; YOUNG, B. The Cell. In: _____. **Wheater's Functional Histology - A Text And Colour Atlas**. 4th.ed.. Edinburgh: Churchill Livingstone, 2000. Cap. 1, p. 3.
- HOSOYA, A. et al. Effects of Fixation and Decalcification of the Immunohistochemical Localization of Bone Matrix Proteins in Fresh-frozen Bone Sections. **Histochem. Cell Biol.**, Berlin, v. 123, p. 639-646, June 2005.
- KIERNAN, J.A. Decalcification and Other for Hard Tissues. In: _____. **Histological & Histochemical Methods: Theory and Practice**. 3th.ed. Oxford: Butterworth Heinemann, 1999. P. 36-40.
- MASAKO, M. et al. SHED: Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 100, no. 10, p. 5807-5812, May 2003.
- MORSE A. Formic Acid-Sodium Citrate Decalcification and Butyl Alcohol Dehydration of Teeth and Bones for Sectioning in Paraffin. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v. 24, 143-153, June 1945.
- PAGE K. et al. Bone. In: BANCROFT, J.D.; STEVENS, A. **Theory and Practice of Histological Techniques**. 4th.ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1996. P. 309-339.
- PENNA, L. A. P.; RODE, S. M. Estudo Morfológico da Polpa de Ratos Wistar frente a uma Oclusão Traumática Experimental. **Pesq. Odontol. Brasil.**, São Paulo, v. 14, n. 2, p. 159-164, abr./jun. 2000.
- RODE, S. M.; FARIA, M. R.; MONTEIRO, M. P. O Uso de Microondas para Descalcificação de Tecidos Mineralizados da Mandíbula de Ratos. **Rev. Odontol. Univ. São Paulo**, São Paulo, v. 10, n. 1, p. 15-18, jan./mar. 1996.
- TINLING, S.P.; GIBERSON, R.T.; KULLAR, R.S. Microwave Exposure Increases Bone Demineralization Rate Independent of Temperature. **J. Microsc.**, Oxford, v. 215. p. 230-235, Sept. 2004.
- TSUKAMOTO-TANAKA, H. et al. Histochemical and Immunocytochemical Study of Hard Tissue Formation in Dental Pulp During the Healing Process in Rat Molars after Tooth Replantation. **Cell Tissue Res.**, Berlin, v. 325, p. 219-229, Aug. 2006.
- VIER-PELISSER, F.V. **Efeito Da Teleterapia Fracionada em Polpa Dentária de Ratos - Análise em Microscopia Óptica e Eletrônica de Transmissão**. 2005. 131f. Tese (Doutorado em Estomatologia Clínica) – Faculdade de Odontologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

Endereço para correspondência:

Fernando Borba de Araújo
Faculdade de Odontologia
Rua Ramiro Barcelos, 2492
Porto Alegre - RS
CEP: 90035-003