

X LOURENÇO BOZZO

ALTERAÇÕES DA INERVAÇÃO PULPAR APÓS
TRANSECÇÃO DO NERVO ALVEOLAR INFERIOR
AO NÍVEL DA LÍNGULA DA MANDÍBULA: ESTUDO
EXPERIMENTAL EM CÃO [*Canis familiaris*]

Tese apresentada para o Concurso de Habilitação
à Docência Livre na Disciplina de Patologia do
Departamento de Medicina Oral, da Faculdade
de Odontologia de Piracicaba, da Universidade
Estadual de Campinas.

PIRACICABA
1975

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

ã Vera Lúcia, minha esposa e aos
meus filhos Luciana, Mário Egídio,
Paulo César e Juliana.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof.Dr. José Merzel, Diretor da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, exemplo de trabalho e dedicação, pelo apoio, pela amizade, pela confiança e pelo incentivo que sempre nos tem dado.

Aos assistentes Mário Roberto Vizioli e Oslei Paes de Almeida, companheiros, amigos e colaboradores de todas as horas no desenvolvimento das diferentes atividades na disciplina de Patologia.

Aos professores Cássio O.G. Munhoz, Gyorgy Bohm e Darcy Oliveira Tosello pela colaboração no desenvolvimento da parte de microscopia eletrônica .

Ao Prof.Dr. Benedicto de Campos Vidal, pela oportunidade que nos ofereceu ao iniciarmos na carreira universitária, tendo com a sua perseverança, entusiasmo e cultura influenciado a nossa formação científica.

Aos técnicos de Laboratório Antônio Kerches de Campos, Adilson P. Pereira e Cícero A.A. Leite pela dedicada colaboração na consecução deste trabalho.

Ao acadêmico Hamilton L. Louzada e ao senhor Sebastião de Barros, responsáveis pela datilografia e impressão desta tese

SUMÁRIO

I - INTRODUÇÃO	1
II - REVISÃO DA BIBLIOGRAFIA	5
III - MATERIAIS E MÉTODOS	12
1. Considerações Gerais	12
2. Estudo Histoquímico dos Lipídios	14
2.1. Sudan Negro (Sudan Black B)	14
2.2. Hemateína Ácida	15
2.3. Tetróxido de ôsmio-alfa-naftilamina	16
3. Estudo da Birrefringência	16
4. Estudo da Morfologia	16
4.1. Cortes de 0,5 micron (A. de Metileno)	16
4.2. Impregnação pela prata (Mét. de Castro)	17
5. Microscopia Eletrônica	18
IV - RESULTADOS	18
1. Aspectos Gerais da Inervação Pulpar	18
2. Estudo Histoquímico dos lipídios	19
2.1. Sudanofilia	19
2.2. Reação da Hemateína Ácida	24
2.3. Reação tetróxido de Ôsmio	30
3. Estudo da Birrefringência	34
4. Estudo Morfológico	39
4.1. Impregnação pela prata	39
4.2. Cortes de 0,5 micron (Azul de Metileno)	42
5. Microscopia Eletrônica	46
V - DISCUSSÃO	57
VI - CONCLUSÕES	74
VII - RESUMO	76
VIII - REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78

I - INTRODUÇÃO

A polpa dental é uma estrutura cujo comportamento, tanto no homem como em animais de laboratório, tem sido objeto de extensiva investigação. A presença de grande número de fibras nervosas, tanto mielinizadas como amielinizadas (que conferiu à polpa, a denominação popular de "nervo do dente"), tem suscitado nos pesquisadores indagações sobre a significância funcional desta tão profusa inervação. Do ponto de vista clínico, um dos aspectos de maior importância refere-se à potencialidade regenerativa e à sua capacidade de responder aos estímulos a que está sujeita.

Alguns autores, entre os quais King (1936), Edwards & Kitchin (1938), Butcher & Taylor (1951), Miller (1957), Brown, Kupfer & Darlington (1961), Avery et alii (1971) Torneck et alii (1972) procuraram através de diferentes métodos avaliar as possíveis implicações da inervação, com o desenvolvimento, erupção e reabsorção do dente, formação de dentina e com possíveis alterações pulpares. Van Hassel (1973) ressalta de maneira clara três das principais funções da polpa: elaborar e reparar os tecidos calcificados nos quais está incluída; responder à irritação produzindo padrões de atividades neurais que dão a sensação de dor, e manter a vitalidade dos seus constituintes celulares provendo-os de oxigênio e de nutrientes suficientes para suas necessidades metabólicas. Para desempenhar estas funções a polpa possui uma estruturação que poderia parecer compatível não fosse esta abundante inervação.

Outros autores preocuparam-se em estudar a inervação de polpas normais ou alteradas, através de estudos morfológicos, histoquímicos, histofísicos e ultraestruturais, entre os quais Held & Baud (1955), Matthews, Dorman & Bishop (1959), Uchizono & Homma (1959) Sauerwein (1965), Nishijima, Imanishi & Miyoshi (1964 e 1966), Leranath & Csanyi (1967), Harris & Griffin (1968), Vacek, Plackova & Bures (1969), Cahen & Frank (1970), Cireli (1971), Bozzo & Almeida (1972) Almeida & Bozzo (1973) e outros.

A polpa dental, como qualquer tecido vivo tem necessidade de detectar e de responder às alterações do meio ambiente possuindo na sua estruturação uma trama de fibras sensoriais e motoras, que permite o preenchimento das suas funções de defesa e vasomotora. A presença de fibras nervosas contendo colinesterase e terminais monoaminérgicos entre os vasos sanguíneos tem sido demonstrada através dos trabalhos realizados por Pohto & Antila (1968), Kukletova (1969), Kukletova, Zahradka & Lukas (1968) e indicam que os vasos sanguíneos da polpa dental podem estar sob ambos os controles, simpático e parassimpático. Do ponto de vista fisiológico, a inervação pulpar apresenta muitos problemas que precisam ser estudados.

Muitos diagnósticos clínicos ou mesmo tratamentos dentais propostos, são estabelecidos em função da sensibilidade pulpar, embora se saiba que existe uma significativa variabilidade da quantidade de fibras de uma polpa e outra, que pode interferir nas manifestações de sensibilidade de um dente. Apesar do consistente número de trabalhos sobre os mais dife-

rentes aspectos da histofisiopatologia pulpar, parece ainda existir uma carência de informações com relação a importância e significação dessa inervação tão abundante. Em razão disso, foi proposta esta pesquisa.

Entende-se que as fibras nervosas sensoriais e motoras devam participar efetivamente da histofisiologia pulpar permitindo a manutenção do seu equilíbrio homeostático. Entretanto, desconhece-se até que ponto esta inervação é imprescindível ao tecido pulpar, e quais são efetivamente as modificações estruturais e comportamentais que esta polpa sofre quando as fibras nervosas degeneram.

Existem algumas situações clínicas, nas quais o Nervo Alveolar Inferior pode ser seccionado. Eventualmente, durante uma cirurgia qualquer, um acidente, ou mesmo por indicação terapêutica, pode haver uma transecção do nervo alveolar, com implicações para a polpa de todos os dentes situados distalmente em relação ao ponto de transecção.

O objetivo do presente trabalho é estudar inicialmente as alterações das fibras nervosas após as transecções do nervo.

Através de técnicas histoquímicas, histofísicas e de microscopia eletrônica, pretende-se avaliar as modificações estruturais que as fibras nervosas pulpares sofrem, em diferentes períodos após a transecção.

Este estudo será conduzido experimentalmente em cães fazendo-se a ressecção unilateral do nervo alveolar inferi

or, ao nível llingula da mandíbula (Espinha de Spix).: Após períodos variáveis de tempo, será feita a remoção da polpa dental dos caninos inferiores para observação microscópica, servindo como controle a polpa do lado não operado.

II - REVISÃO DA BIBLIOGRAFIA

A falta de estudos relacionados especificamente com os objetivos da presente investigação fez com que esta revisão fosse conduzida no sentido de apresentar alguns dos principais trabalhos que trouxessem algum tipo de informação relativa a este experimento. Nestas condições, serão apresentados os trabalhos de autores que estudaram sob ângulos diferentes as implicações da transecção do nervo alveolar inferior, os trabalhos que mostram as modificações pulpares observadas tanto ao microscópio eletrônico como em microscopia ótica comum, e finalmente, alguns trabalhos que analisaram detalhes histoquímicos da degeneração das fibras nervosas de diferentes partes do organismo.

Desde 1835, quando Raschkow descreveu pela primeira vez os nervos da polpa dental, muitas pesquisas tem sido realizadas, sob os mais variados aspectos a fim de se conhecer melhor estes elementos.

Com relação às possíveis implicações da inervação pulpar com o grau de desenvolvimento e erupção do dente existem alguns trabalhos importantes. King (1936) observou que após ressecção unilateral do nervo dentário inferior em cães jovens havia uma aceleração inicial na erupção dos dentes permanentes, do lado operado, enquanto que em coelhos, esta mesma cirurgia provocava uma aceleração inicial no crescimento dos incisivos inferiores, seguida por um período de erupção retardada.

Nesta mesma linha de pesquisa, Edwards et alii

(1938) observaram em filhotes de gato, que após a ressecção do nervo dentário inferior, 60% dos germes dentais do lado operado mostrava um aumentado grau de crescimento. Os efeitos da denervação e isquemia sobre o dente do macaco observados por Butcher & Taylor (1951) indicavam que o dente se desenvolvia e mantinha sua normal estrutura sem o suprimento nervoso, e que a isquemia raramente se estabelecia a ponto de causar uma injúria permanente.

Miller (1957), Taylor & Butcher (1951) e Brown et alii (1961) estudando os efeitos da inervação na erupção dos incisivos inferiores de ratos, observaram também uma aceleração do desenvolvimento desses dentes, no lado em que o nervo era lesado. Desses autores, apenas Butcher & Taylor (1951) e mais recentemente, Avery et alii (1971), Torneck et alii (1972) e Frank et alii (1972) se preocuparam em discutir as alterações estruturais que tenham ocorrido na polpa em consequência da denervação.

Por outro lado, as alterações que as fibras nervosas sofrem em diferentes situações clínicas ou experimentais, tem sido amplamente estudadas do ponto de vista morfológico e ultraestrutural.

Através de estudos em secções impregnadas pela prata, Leranthy & Csanyi (1967) fizeram uma detalhada descrição da arborização das fibras nervosas na dentina e das relações destas fibras com as paredes vasculares. Discutem ainda o possí-vel envolvimento desta trama perivascular no mecanismo da dor pulpar inflamatória e na sensibilidade da dentina cervical.

Fearnhead & Linder (1956) utilizando a impregnação pela prata cuidadosamente controlada, revizaram algumas observações já estabelecidas, sobre a formação de plexos nervosos na prēdentina e da distribuição destas fibras na dentina já calcificada, concluindo ser possível a existência de fibras submicroscópicas como prolongamentos nervosos dentro dos tūbulos dentinários. Esta observação parece ter sido confirmada posteriormente através da M. E. por Frank (1966 e 1968).

Plackova (1966) encontrou variados graus de alterações da inervação de dentes cariados. Proliferação e desintegração do tecido pulpar estavam associados em vários graus, sendo que em polpas com inflamação, aparecia um espessamento irregular, abundantes ramificações, rompimento e fragmentação dos feixes e das fibras em unidades menores. Nos casos de formação de pólipos pulpares, Martinelli & Toledo (1970) observaram que estes eram ricamente inervados com fibras mielinizadas e amielinizadas, aventando a possibilidade de que o sistema neuro-vegetativo esteja relacionado com o mecanismo de produção dos pólipos pulpares.

Alguns detalhes dos processos degenerativos dos nervos em consequência de cáries e da inflamação subsequente são descritas por Bernick (1973) que mostra as alterações que envolvem os nervos e vasos, em resposta a processos irritativos, tais como cárie e restaurações.

O próprio Bernick (1967) já havia estudado os efeitos da idade sōbre o suprimento nervoso, tendo observado, em polpas humanas, que o processo de calcificação comprometia pri-

meiro o tecido conjuntivo que envolve os nervos e então os próprios nervos. O processo de calcificação levava à obliteração dos nervos, especialmente na porção radicular, e em consequência, à uma diminuição do número de ramificações nervosas na porção coronária.

Sauerwein (1965) estudando as fibras nervosas de polpas dentais em degeneração, coradas pela prata, mostrou alterações estruturais tais como fragmentações, varicosidades, espessamentos nodulares e cilíndricos, assim como pequenas vacuolizações dentro das fibras. Acrescentou ainda que as alterações observadas, das estruturas nervosas, podiam dar uma explicação às alterações do sistema funcional célula-vaso-nervo, afirmando que é preciso investigar se a metamorfose do órgão medular é ou não primariamente causada por uma degeneração dos elementos nervosos.

Almeida & Bozzo (1973) conjugando métodos de impregnação pela prata, sudanofilia e microscopia de polarização, fazem uma descrição dos aspectos morfológicos das fibras nervosas de polpas dentais humanas normais e inflamadas. Observaram nas polpas inflamadas, marcadas alterações degenerativas, tais como varicosidades, formação de vacúolos e fragmentação, sendo que os nervos mielinizados corados pelo Sudan exibiam dicroísmo mesmo em áreas de inflamação.

Bozzo & Almeida (1972) discutindo os aspectos histoquímicos dos lipídios das fibras mielinizadas de polpas dentais humanas normais e inflamadas, observaram que a gradual des

truição do tecido pulpar durante a inflamação determina alterações também na estruturação das fibras nervosas. Discutem ainda a birrefringência e o dicroísmo destas fibras nervosas alteradas.

Com o advento da Microscopia Eletrônica, uma significativa soma de informações passou a ser incorporada ao que já se sabia sobre o tecido pulpar. Embora o número de trabalhos em M. E. sobre polpa, seja pequeno, não se pode negar que a microscopia eletrônica já trouxe uma série de importantes informações sobre a ultraestrutura dos nervos pulpares. Matthews et alii (1959) estudaram, em M. E., a ultra-estrutura da polpa dental, dando ênfase especial às relações neuromusculares. O achado de complexos de fibras nervosas autônomas "abraçando" as células musculares lisas das arteríolas oferece uma base histológica para a transmissão de impulsos vasoconstritores aos elementos vasculares.

Nishiyama et alii (1964 e 1966) estudando as alterações das fibras nervosas de polpas dentais humanas, observaram que a bainha de mielina mostra alterações semelhantes à degeneração Walleriana; variações estas tais como nódulos de mielina, protusão na célula de Schwann, e envolvimento no citoplasma. Descreveram ainda a mielina, mostrando detalhes dos nódulos de Ranvier e das fendás de Schmidt-Lantermann.

Vacek et alii (1969)- fizeram um estudo em M.E., da polpa dental humana, encontrando numerosas fibras nervosas mielinizadas e vegetativas, sendo as fibras vegetativas finas e chegando em grande número na parte externa das células de Schwann.

Descreveram ainda numerosas terminações nervosas de forma arredondada ou ovoide, na camada odontoblástica. A bainha de mielina tinha muitas vezes um curso atípico, que poderia ser explicado como o resultado da enorme ramificação dessas fibras durante sua proliferação, enquanto que a aglomeração de mitocôndrias nas fibras terminais nos odontoblastos poderia estar associada com sua proliferação. Relacionaram estas duas evidências com a considerável reatibilidade das fibras nervosas da polpa dental. Taatz e Stiefel (1970) fizeram uma revisão dos principais trabalhos sobre ultraestrutura do nervo pulpar apresentando a seguir uma detalhada descrição e ilustração dos próprios resultados - obtidos através da M.E. em polpas dentais humanas. Mostraram em polpas normais, as principais características ultraestruturais das células de Schwann, do axoplasma e do desenvolvimento da bainha de mielina.

Quase que simultaneamente às observações de Taatz e Stiefel (1970) apareceu o trabalho de Cahen que descreveu de maneira muito detalhada os diferentes aspectos da ultraestrutura pulpar. Cahen observou ao M. E. polpas humanas normais, descrevendo os elementos celulares, a substância intercelular amorfa e fibrilar, as estruturas vasculares, e de maneira especial a ultraestrutura das fibras nervosas pulpares. A Axoplasma, a bainha de mielina e células de Schwann foram muito bem descritas neste trabalho.

O'Daly & Imaeda (1967) - estudando a degeneração Waleriana em nervos cutâneos, através do M.E., observaram que a degeneração do nervo começa com uma condensação axoplasmática e

o acúmulo de mitocôndrias e mielina desorganizada. A este estágio, macrófagos migram através dos vasos capilares e penetram nos feixes nervosos. Células perineurais aumentam sua atividade pinocitótica. Debris mielínicos são descarregados das células de Schwann e fagocitados por macrófagos. Estes macrófagos atravessam a bainha perineural e depois retornam aos capilares. Células de Schwann em regeneração também digerem debris mielínicos. O processo de regeneração ocorre 7 dias após a injúria, caracterizado por mitose das células de Schwann dentro da membrana basal remanescente e por um crescimento axônico enfechado lateralmente pela célula de Schwann e somente observado em pequenos nervos. Multimesaxônicos invaginados giram o cone de crescimento formando as lamelas de mielina em camadas múltiplas. Durante o estágio degenerativo, as células perineurais proliferam, aumentam suas organelas citoplasmáticas e preenchem os buracos deixados pelos macrófagos. Observaram ainda que nova membrana basal era sintetizada em torno de ambas, células perineurais e células de Schwann dentro da velha membrana basal envolvente. A regeneração do nervo cutâneo era completada 2 a 3 semanas após a lesão ter ocorrido.

Através desta breve revisão da literatura parece claro que a inervação pulpar carece de melhor conhecimento, não só com relação às suas manifestações clínicas, mas também com relação às modificações estruturais e comportamentais a que está sujeita.

O desenvolvimento desta pesquisa poderá oferecer oportunidade para se compreender um pouco melhor, alguns dos fenômenos relacionados com a degeneração das fibras nervosas pulpare e das suas possíveis implicações.

III - MATERIAIS E MÉTODOS

1. Considerações Gerais:

O animal utilizado nesta pesquisa foi o cão (*Cannis familiaris*), de idade não determinada, mas, com características gerais de um cão adulto jovem, de peso variável entre 8 a 14 quilos. Depois do cão ser anestesiado com injeção intraperitoneal de Nembútal (33 miligramas por quilo de peso do animal), fazia-se uma incisão no lado direito do bordo inferior da mandíbula, promovendo-se a seguir um afastamento do tecido muscular e conjuntivo frouxo até permitir uma visão da entrada do nervo alveolar (N. alveolaris inferior) no corpo da mandíbula, ao nível da llingula da mandíbula (*Llingula mandibulae*).

O feixe nervoso era então separado do vascular (fig. 1), fazendo-se a incisão do nervo bem próximo à entrada do forame da mandíbula, com remoção de um fragmento de aproximadamente 5 milímetros. Os tecidos afastados eram repostos nos seus lugares, com sutura dos planos profundos e superficiais. A secção do nervo era feita apenas do lado direito da mandíbula, ficando o lado esquerdo como controle. A cirurgia era feita com os cuidados gerais de assepsia e o animal era mantido em ambiente com condições satisfatórias de limpeza, onde continuava a se alimentar normalmente até completar os períodos do experimento, quando então, era sacrificado.

Decorridos os prazos estabelecidos na programação da pesquisa, 3, 10, 20, 30 e 60 dias, o animal era novamente anes-

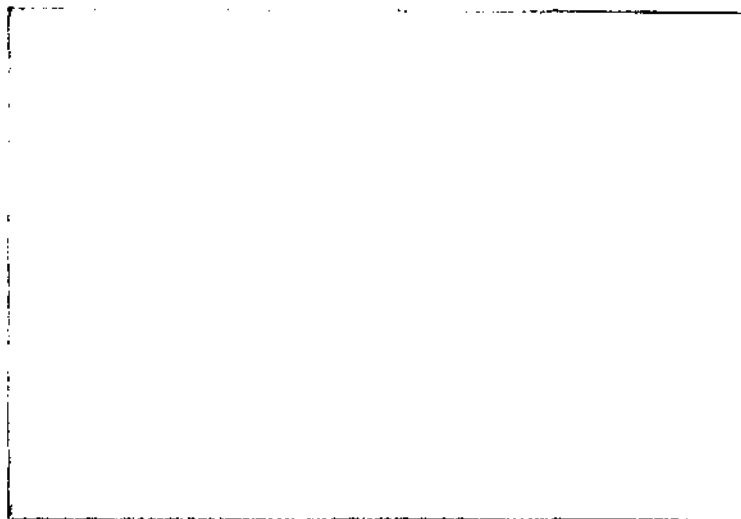


Fig. 1

- Aspecto macroscópico do feixe vâsculo-nervoso penetrando no forame da mandíbula. Observa-se o nervo alveolar inferior (N), já separado do feixe vascular (V). Durante a cirurgia, o nervo (N) era seccionado bem próximo à língua da mandíbula, removendo-se um fragmento de aproximadamente 5 milímetros. A seta indica, na face interna da mandíbula, a língua da mandíbula. Aumento aproximado: 2X.

tesiado com Nembutal, e por fratura do osso mandibular ao nível da implantação dos pré-molares eram removidos os caninos do lado esquerdo e direito. Rãpidamente, (em não mais de 30 segundos) os dentes eram fraturados numa prensa especial, obtendo-se as polpas do lado operado (A) e do lado controle (B), as quais eram colocadas em fixadores especiais segundo os processamentos que deveriam seguir em cada mētodo de estudo. Para cada perĩodo do experimento eram sacrificados 3 animais. Uma polpa era processada para observação ao microscĩpio eletrĩnico, a outra era impregnada pela prata segundo o mētodo de Castro e incluída em parafina, e uma terceira, era cortada por congelação no criostato para estudo histoquĩmico dos lipĩdios.

2- Estudo Histoquĩmico dos Lipĩdios

As polpas obtidas por fratura dos dentes foram fixadas em formol-cãlcio de Baker (Lison 1960) por um perĩodo aproximado de 12 horas. A seguir eram seccionadas num criostato, obtendo-se cortes com 10 microns de espessura. Foram utilizados, com algumas pequenas modificações os mētodos histoquĩmicos clãssicos, compilados e discutidos por Adams (1969).

Foram feitas as seguintes colorações:

2.1. Sudan Negro (Sudan Black B)

Os cortes obtidos no criostato eram:

- a) Lavados em água
- b) Passados rãpidamente em alcool 60%
- c) Corados por 15 minutos em soluçãõ saturada de SBB em alcool 60%

d) Diferenciados em álcool 60%

e) Lavados em água e montados em glicerina-gelatina

Esta coloração era feita em 2 conjuntos de lâminas; um que havia sido previamente tratado por Acetona durante 2 horas a 4 graus centígrados, e outro normal, sem tratamento prévio.

2.2. Hemateína Ácida (Teste de Baker, com modificações para cortes sobrenadantes)

Os cortes obtidos no criostato eram colhidos numa placa de Petri com formol-cálcio e a seguir recebiam o seguinte tratamento:

- a) Passavam ao Bicromato-cálcio, permanecendo por 18 horas a temperatura ambiente e a seguir, por mais 24 horas, a 60°C.
- b) Eram lavados por 2 horas em água corrente e corados com a Hemateína Ácida por 5 horas, a 37°C (solução recém-preparada).
- c) A seguir eram lavados em água corrente e diferenciados em bórax-ferricianeto, por 18 horas, a 37°C.
- d) Eram lavados em água e montados em glicerina-gelatina.

Esta reação também foi feita em dois conjuntos de lâminas; um que recebia tratamento prévio por 2 horas, a 4°C com uma solução de clorofórmio-metanol-Ácido Clorídrico (66v:33v:1v) e outro normal, não tratado.

2.3. Tetróxido de Osmio-alfa-Naftilamina (OTAN)

- a) Os cortes obtidos no criostato eram colocados por 18 horas, à temperatura ambiente, numa solução de tetróxido de ósmio-clorato de potássio. (1:3).
- b) A seguir eram lavados em água destilada e tratados por uma solução aquosa saturada de alfa-naftilamina por 10-15 minutos.
- c) Novamente eram lavados em água e montados em glicerina-gelatina.

Esta reação foi feita também em 2 conjuntos de lâminas; um previamente tratado por uma solução aquosa 2N de NaOH, a 37°C por 1 hora, e outro, normal não tratado.

3. Estudo da Birrefringência

- a) Os cortes já fixados em formol-cálcio, eram lavados em água destilada, montados em lâmina com glicerina-gelatina e observados ao microscópio de polarização (Fotomicroscópio Zeiss-Pol).

As observações foram feitas em 3 conjuntos de lâminas; um previamente tratado por Clorofórmio-Metanol-Ácido Clorídrico, a 4°C por 2 horas; outro tratado pela Acetona a 4°C por 2 horas, e outro normal, não tratado.

4. Estudo da Morfologia

4.1. Cortes de 0,5 micron corados pelo Azul de Metileno

Os cortes de 0,5 micron foram obtidos no Micrótomo

Porter-Blum, nos blocos preparados para M.E..

As polpas que foram processadas para observações ao M.E., receberam o seguinte tratamento:

- a) Após a fratura do dente, as polpas eram rapidamente seccionadas em fragmentos de mais ou menos 2 milímetros e fixadas em Glutaraldeído a 2%, por 4 horas, a 4°C.
- b) A seguir, os fragmentos eram pós-fixados em tetróxido de Ósmio a 4°C, por 1 hora, lavados, desidratados e incluídos. Parte dos fragmentos foram incluídos em Epon e parte em Durcupan.
- c) Os cortes finos foram obtidos num ultramicrótomo de Porter-Blum, usando navalha de vidro.
- d) As colorações foram feitas com Azul Metileno e montados com bálsamo.

4.2. Impregnação pela prata (Método de Castro)

As polpas a serem impregnadas pela prata foram colocadas no fixador de Castro, imediatamente após a fratura do dente. Decorridas 24 horas estas polpas eram lavadas durante 12 horas em água corrente, e colocadas durante 12 horas, em álcool absoluto contendo algumas gotas de amoníaco. A seguir, eram lavadas rapidamente em água destilada e colocadas no nitrato de prata a 2% e deixadas na estufa a 37°C por 15 dias. Decorridos os 15 dias as polpas eram lavadas e colocadas num redutor por 12 horas, à temperatura ambiente. O redutor consistia de uma solução recém-preparada de 0,5g de ácido pirogálico; 5cc de formol neu-

tro e 45cc de água destilada. A seguir, procedia-se à desidratação, diafanização em benzol e inclusão em parafina. As secções eram feitas com 7 microns de espessura, e montados em balsamo.

5. Microscopia Eletrônica

O método de fixação, pós-fixação e inclusão para a M.E. estão descritos em 4.1. (a e b).

Para obtenção dos cortes finos foi utilizada navalha de diamante e um ultramicrotomo Reichert. As colorações das secções (telas) foram feitas com Acetato de Urânio e Citrato de chumbo.

Foram montadas duas séries de telas. Uma série (A) contendo as polpas do lado operado e outra série (B) contendo as polpas do lado não operado.

IV - RESULTADOS

1. ASPECTOS GERAIS DA INERVAÇÃO PULPAR

A polpa dental é um dos tecidos mais ricamente innervados do nosso organismo. Os feixes nervosos entram pelo forame apical do dente, (fig. 16) ramificando-se abundantemente na porção coronária, (fig. 50 e 52). Na polpa dental encontramos dois tipos de fibras nervosas: mielínicas e amielínicas, as quais podem ser encontradas num mesmo feixe, ou separadamente. Estas fibras nervosas, tanto as mielinizadas como as amielinizadas apresentam variações marcantes no seu diâmetro (Fig. 18 e

60). Ao microscópio de polarização as fibras nervosas são birrefringentes (Fig. 38 e 39) com variações significantes segundo a sua integridade estrutural (Fig. 41 e 42).

A microscopia eletrônica permitiu observar com clareza detalhes da ultraestrutura da mielina e do axoplasma, e estes resultados serão apresentados mais adiante. Do material processado para observação ao microscópio eletrônico foram obtidos cortes de 0,5 mícron para observação ao microscópio óptico comum cujos resultados facilitaram a interpretação dos achados ao M.E. Evidentemente, os aspectos morfológicos observados nos cortes de 0,5 mícron mostram detalhes um pouco diferentes daqueles observados através de métodos histoquímicos nos cortes de 10 mícrons (congelação) ou nos de 7 mícrons, das polpas incluídas em parafina. A conjugação desses aspectos evidenciados por diferentes métodos, tais como, microscopia de polarização, microscopia eletrônica e histoquímica poderá permitir uma visão global da estruturação das fibras nervosas da polpa dental, em condições normais e patológicas.

2. ESTUDO HISTOQUÍMICO DOS LIPÍDIOS

2.1. SUDANOFILIA

a) Lado Controle

A coloração pelo Sudan Negro (Sudan Black B) demonstrou a existência de uma uniformidade tintorial e morfológica nas fibras nervosas sudanófilas de todas as polpas normais. Tanto as fibras isoladas no meio do tecido pulpar como aquelas agrupadas em feixes de variáveis diâmetros evidenciavam as cara

cterísticas morfológicas típicas clássicas de fibras normais (Fig. 2, 6 e 10), assumindo uma coloração azulada, homogênea e bem evidente. O tratamento dessas secções com Acetona a 4°C por 1 hora, antes da coloração diminuiu um pouco a intensidade da sudanofilia das fibras nervosas normais (Fig. 4, 8 e 12) sem alterar contudo o seu aspecto geral.

a) Lado Operado

No lado operado a coloração pelo Sudan revelou marcantes alterações morfológicas e tintoriais das fibras nervosas.

Aos 3 dias, já era bem evidente o entumescimento, a formação de varicosidades e fragmentação das fibras nervosas (Fig. 3). A comparação dos aspectos observados no lado controle (Fig. 2) com o lado operado (Fig. 3) permite observar que além das alterações morfológicas ocorre também uma modificação da coloração da fibra, que parece assumir uma tonalidade mais preta em lugar da tonalidade azul-forte das fibras normais. O tratamento com Acetona removeu uma parte do material sudanófilo, diminuindo a intensidade da coloração (Fig. 5). Aos 10 dias, a degeneração das fibras era bem mais evidente. Apenas em algumas poucas áreas, como nas figuras 7 e 9, apareciam restos de fibras, desorganizadas e fragmentadas sendo que no resto do tecido pulpar havia um desaparecimento quase que completo da inervação. Nas áreas onde ainda havia restos de fibras, era frequente a presença de macrófagos. Tanto o material fagocitado pelos macrófagos como os restos das fibras cora-

Legendas das Fotos do Quadro I

- Fig.2 - Feixe de fibras nervosas normais de uma polpa dental, corada pelo Sudan negro.
As fibras mielinizadas apresentam uma uniformidade tintoral e estrutural bem evidente.
Aumento: ± 190X
- Fig.3 - Fibras nervosas de uma polpa dental do lado em que foi feita a transecção do nervo dentário há 3 dias. Alterações morfológicas, com segmentação da fibra formação de glóbulos de material sudanófilo, além de modificações das propriedades tintoriais são bem evidentes a este estágio.
Aumento: ± 480X
- Fig.4 - Fibras nervosas de uma polpa do lado controle, corada pelo Sudan negro após tratamento prévio pela acetona. A uniformidade da morfologia da fibra é ainda bem evidente, apesar de haver ocorrido uma discreta diminuição na intensidade da coloração.
Aumento: ± 300X
- Fig.5 - Fibras nervosas de uma polpa do lado operado há 3 dias. A secção foi corada pelo Sudan negro, após o tratamento pela acetona. As mesmas características morfológicas observadas na fig.3; tendo contudo, havido uma acentuada diminuição do material sudanófilo devido ao trátamento pela acetona.
Aumento: ± 240X.

Quadro I - Fibras nervosas coradas pelo Sudan Negro , antes e apōs o tratamento pela Acetona (legenda das fotos na pāgina oposta).

Legendas das Fotos do Quadro II

Fig. 6 - Fibras nervosas de uma polpa do lado controle de um cão operado há 10 dias. A coloração pelo Sudan negro, mostra o aspecto morfológico típico de uma fibra normal, / sendo bem evidente os nódulos de Ranvier.

Aumento: ± 190X

Fig. 7 - Polpa de um dente do lado operado há 10 dias. As fibras nervosas estão todas desintegradas, aparecendo em algumas áreas restos de fibras que ainda preservam algumas características morfológicas, porém este não é quadro que predomina na polpa.

Aumento: ± 190X

Fig. 8 - Polpa do lado controle, corada pelo Sudan negro, após tratamento da secção pela acetona. São bem evidenciadas ainda as características normais das fibras.

Aumento: ± 120X

Fig. 9 - Feixe de fibras nervosas em degeneração, 10 dias após a transecção do nervo alveolar inferior. A acetona removeu parte do material sudanófilo restando alguns fragmentos da fibra, bem corados pelo Sudan.

Aumento: ± 120X

Quadro II - Fibras nervosas coradas pelo Sudan Negro, antes e após o tratamento pela Acetona (Legenda das fotos na página oposta).

Legenda das fotos do Quadro III

- As figuras 10 e 11 correspondem às polpas dos caninos inferiores, esquerdo e direito, de um cão no qual foi feita a transecção do nervo alveolar inferior esquerdo há 20 dias.

A fig. 10, mostra o lado não operado, com feixes de fibras nervosas bem evidentes, corados pelo Sudan.

A figura 11 é da polpa do canino do lado esquerdo, operado portanto, no qual houve um desaparecimento completo das fibras nervosas. O tecido conjuntivo aparece bem evidenciando características normais.

Aumento da fig. 10: \pm 480X

Aumento da fig. 11: \pm 120X

Fig. 12 - Polpa normal, lado controle.

A secção foi tratada pela acetona a 4°C, não alterando substancialmente a morfologia e a coloração das fibras pelo Sudan negro.

Aumento: \pm 190X

Fig. 13 - A polpa do lado operado há 20 dias, não evidencia qualquer sinal de fibra nervosa.

A secção tratada pela Acetona antes da coloração pelo Sudan não alterou em nada os aspectos morfológicos da polpa.

Aumento: \pm 190X.

Quadro III - Polpa dental corada pelo Sudan Negro, antes e após o tratamento pela Acetona (Legenda das fotos na página oposta).

vam-se intensamente pelo Sudan. O tratamento pela Acetona removeu apenas uma parte desse material sudanófilo (Fig. 9) deixando contudo, parte desse material bem corado pelo Sudan.

Aos 20 dias, houve um desaparecimento completo de todas as fibras nervosas (Fig. 11 e 13). A coloração pelo Sudan permitiu observar um tecido conjuntivo pulpar relativamente normal, sem nenhuma evidência de fibras nervosas. O tratamento das secções pela Acetona não alterou em nada a coloração dessas polpas. As figuras 10 e 12 (lado controle) comparadas com as figuras 11 e 13 (lado operado) evidenciam claramente os detalhes observáveis 20 dias após a transecção.

Aos 30 e 60 dias, foram observados exatamente os mesmos aspectos detectados aos 20 dias. As polpas do lado A (operado), a partir de 20 dias já não mostram, ao microscópio óptico comum, qualquer sinal de fibra nervosa, repetindo estes detalhes aos 30 e 60 dias. A observação cuidadosa dos detalhes mostrados nas figuras 3, 5, 7, 9, 11 e 13, permite uma visão global das alterações das fibras, evidenciáveis pela sudanofilia, antes e após o tratamento por acetona.

2.2. REAÇÃO DA HEMATEÍNA ÁCIDA (TESTE DE BAKER), CONJUGADA COM O TRATAMENTO DAS SECÇÕES PELO CLOROFÓRMIO-METANOL-ÁCIDO CLORÍDRICO

a) Lado Controle

Os resultados observados nas secções coradas pela Hemateína Ácida, são extremamente semelhantes àqueles observados nas polpas coradas pelo Sudan. As fibras normais reagem po

sitivamente ao Teste de Baker, corando-se em azul escuro e apresentando uma morfologia típica, com os nódulos de Ranvier muito bem evidenciados (Fig. 16, 18 e 20). Quando tratadas pelo Clorofórmio-Metanol-Ácido Clorídrico, as fibras perdiam aquela coloração uniforme e homogênea, assumindo um aspecto irregular, com sucessão de áreas escuras e claras (Fig. 24, 26). O tratamento pelo Clorofórmio-Metanol-Ácido Clorídrico parece haver removido parte do material que dava à fibra uma uniformidade tintorial, dando-lhe um aspecto de segmentação bem característica.

b) Lado Operado

No lado operado, o Teste de Baker revelou modificações profundas das fibras nervosas. Aos 3 dias, embora ainda seja bem evidente uma reação Baker positiva, já se observa uma fragmentação tanto das fibras mais finas como das mais espessas (Fig. 15). Neste estágio, observa-se que a fibra começa a assumir o aspecto de um colar. Aos 10 dias, a desintegração das fibras é bem mais intensa, aparecendo apenas algumas massas de material Baker positivo (Fig. 17). Em algumas polpas, o grau de fragmentação era bastante evidente sendo ainda possível notar o aspecto morfológico das fibras enquanto que em outras, apenas apareciam pequenas massas de material Baker positivo, indicando que ali existia uma fibra ou um feixe nervoso (Fig. 17).

Aos 20 dias, já não se notava mais, em nenhuma sec

Legenda das fotos do Quadro IV

Fig. 14 - Fibra nervosa isolada no tecido pulpar normal, corado pela Hemateína ácida.

A uniformidade estrutural da fibra nervosa do lado controle de um cão operado há 3 dias é bem evidenciada, / pela Hemateína. Os nódulos de Ranvier também aparecem de maneira destacada.

Aumento: + 190X

Fig. 15 - No lado operado, aos 3 dias já são evidentes as alterações morfológicas das fibras coradas pelo Teste de Baker. A Hemateína cora de maneira menos intensa a mielina em desintegração. São evidentes ainda, as varicosidades / da fibra.

Aumento: + 190X

Fig. 16 - Feixe de fibras nervosas coradas pela Hemateína.

Lado controle de um cão operado há 10 dias. Os aspectos morfológicos são bem normais, assumindo uma coloração intensa pelo Teste de Baker.

Aumento: + 190X

Fig. 17 - No lado operado, apenas restos das fibras coradas pela Hemateína ácida. Pequenos fragmentos Baker positivos podem ser observados nas áreas préviamente ocupadas pelo feixe nervoso.

Aumento: + 190X

Quadro IV - Polpa dental corada pela Hemateína Ácida (Teste de Baker), antes do Tratamento por Clorofórmio-Metanol-Ácido Clorídrico (Legenda das fotos na página oposta).

Legenda das fotos do Quadro V.

Fig. 18 - Aspecto morfológico de um feixe nervoso de uma polpa controle corada pela Hemateína ácida (Teste de Baker).
Numerosos nódulos de Ranvier são bem evidentes - Cão operado há 20 dias.

Aumento: + 190X

Fig. 19 - Aspecto morfológico da polpa no lado em que a transecção do nervo alveolar inferior foi feita há 20 dias - Coloração: Hemateína ácida.

Não mais existem fibras nervosas.

Aumento: + 190X

Fig. 20 - Polpa normal; lado controle de um cão operado há 60 dias. A secção foi corada pela Hemateína ácida e mostra um conjunto de fibras bem coradas.

Aumento: + 190X

Fig. 21 - O lado operado, mostra que após 60 dias, a polpa está completamente denervada. Nenhum sinal de fibra nervosa é evidenciado.

Aumento: + 190X.

Quadro V - Polpa dental corada pela Hemateína Ácida
(Teste de Baker), antes do Tratamento pe
lo Clorofórmio-Metanol-Ácido Clorídrico
(Legenda das fotos na página oposta).

Légenda das fotos do Quadro VI

Fig. 22 - Conjunto de fibras normais, corados pela Hemateína áci da, ap^õs o tratamento pelo Clorof^õrmio-Metanol-Ácido / Clor^ídrico.

Aumento: 190X

Fig. 23 - Fotomicrografia de uma fibra nervosa depois de 3 dias de transecção. A secção foi corada pela Hemateína, sendo pr^êviamente tratada pelo Clorof^õrmio-Metanol-Ácido/ Clor^ídrico.

O aumento de ± 1200X permite observar as alterações / que a fibra sofre com o tratamento, neste est^ágio.

Fig. 24 - Fibras normais tratadas pelo Clorof^õrmio-Metanol-Ácido Clor^ídrico antes da coloração pela Hemateína. Parte do material Baker positivo foi removido, tornando os n^õdu los de Ranvier bem evidentes.

Aumento: ± 480X

Fig. 25 - Ausência completa de fibras nervosas ou seus restos, 10 dias ap^õs a transecção do nervo alveolar inferior. Teste de Baker, precedido pelo tratamento com o Cloro- f^õrmio-Metanol-Ácido Clor^ídrico.

Aumento: ± 190X.

Quadro VI - Polpa dental corada pela Hemateína Ácida (Teste de Baker) após tratamento pelo Clorofórmio-Metanol-Ácido Clorídrico (Legenda das fotos na página oposta).

Legenda das fotos do Quadro VII

Fig. 26 - Fibra Normal de uma polpa dental do lado controle (normal) de um cão operado há 20 dias. O tratamento pelo/ Clorofórmio-Metanol-Ácido Clorídrico removeu parte do material lipídico dando à fibra um aspecto característico.

Aumento: \pm 480X

Fig. 27 - Polpa do lado operado há 20 dias. Nenhuma fibra ou restos de fibras aparecem a este estágio. A secção foi tratada previamente pelo Clorofórmio-Metanol-Ácido Clorídrico antes do tratamento pela Hemateína.

Aumento: \pm 300X

Fig. 28 - Feixe de fibras normais, do lado controle de um cão operado há 60 dias.

Teste de Baker em secções previamente tratadas pelo / Clorofórmio-Metanol-Ácido Clorídrico.

Aumento: \pm 190X.

Fig. 29 - Tecido pulpar do lado operado há 60 dias. Ausência de fibras nervosas.

Coloração: Hemateína Ácida após o tratamento pelo Clorofórmio-Metanol-Ácido Clorídrico.

Aumento: \pm 480X.

Quadro VII - Polpa dental tratada pela Hemateína Ácida (Teste de Baker) após o tratamento pelo Clorofórmio-Metanol-Ácido Clorídrico (Legenda das fotos na página oposta).

ção a presença de nervos (Fig. 19). Aos 30 e 60 dias, repetiam-se os mesmos aspectos observados aos 20 dias. As figuras 19 e 21, mostram os aspectos morfológicos normais de uma polpa sem a presença de nenhuma fibra nervosa evidenciável pela coloração da Hemateína Ácida. A figura 19 corresponde ao lado operado há 20 dias, enquanto que a figura 21, mostra o aspecto pulpar após 60 dias. As secções tratadas pelo Clorofórmio-Metanol-Ácido Clorídrico mostram alguns detalhes importantes do ponto de vista histoquímico. A figura 23 mostra de maneira eloquente que uma parte do material Baker positivo foi removido, aparecendo a fibra nervosa toda perfurada e com áreas onde a reação não se positivou. Aos 10 dias, o Clorofórmio-Metanol-Ácido Clorídrico removeu, todo o material Baker positivo, aspecto observado também aos 20, 30 e 60 dias, e mostrado nas figuras 25, 27 e 29.

2.3. REAÇÃO DO TETRÓXIDO DE ÓSMIO-ALFA NAFTILAMINA (OTAN)

a) Lado Controle

As secções coradas pelo OTAN repetiram exatamente os resultados obtidos com o Sudan e com o Teste de Baker.

No lado não operado, que serviu como controle, as fibras nervosas coraram-se uniformemente assumindo uma coloração laranja-avermelhada evidenciando uma morfologia homogênea, típica de fibras normais, com os nódulos de Ranvier muito bem destacados (Fig. 30). Este aspecto, da polpa normal aos 3 dias, repetiu-se com os mesmos detalhes aos 10, 20, 30 e 60 dias. As secções que foram submetidas ao tratamento

pelo Hidróxido de Sódio antes da coloração, mostraram alterações discretas, porém, significativas. A figura 34, mostra que apesar da remoção de algum material lipídico, ainda existe certa uniformidade tintorial das fibras normais.

b) Lado Operado

No lado operado, as secções coradas pelo OTAN mostraram os aspectos morfológicos típicos de um processo degenerativo das fibras nervosas, já descritos na literatura. Aos 3 dias, a perda da homogeneidade estrutural da fibra era bem evidente, com formação de massas OTAN-positivas semelhantes às contas de um rosário, demonstrando uma fragmentação acentuada da bainha de mielina (Fig. 31). Esta segmentação das fibras ocorreu exatamente ao nível dos nódulos de Ranvier.

O tratamento pelo NaOH não provocou alterações significativas na coloração pelo OTAN (Fig. 35). As fibras embora segmentadas continuavam a corar acentuadamente pelo OTAN. Aos 10 dias, a fragmentação era bem mais evidente, com uma redução acentuada do material OTAN-positivo na polpa. Especialmente nas áreas onde havia feixes nervosos, era ainda perceptível a morfologia de fibras, fracamente coradas ao lado de massas mais fortemente coradas (Fig. 32). O tratamento das secções pelo NaOH eliminou uma boa parte do material OTAN-positivo presente, de tal forma, que apenas vestígios de material OTAN-positivo restaram nas secções tratadas pelo hidróxido de sódio (Fig. 36).

Aos 20, 30 e 60 dias, tanto as secções tratadas pelo NaOH-OTAN, como aquelas tratadas somente pelo OTAN, não

Legenda das fotos do Quadro VIII

Fig. 30 - Polpa dental normal (lado controle) de um cão operado há 3 dias, corada pelo OTAN (tetróxido de ósmio-alfa-naftilamina). Fibras normais.

Aumento: \pm 190X

Fig. 31 - Polpa dental do lado operado há 3 dias. Varicosidades e fragmentação são bem evidentes a este estágio.

Coloração: OTAN

Aumento: \pm 190X

Fig. 32 - Polpa dental do lado operado há 10 dias. Apenas em algumas áreas existem fragmentos de fibras/bem coradas. A maior parte do feixe nervoso não se cora pelo OTAN a este estágio.

Aumento: \pm 190X

Fig. 33 - Polpa dental do lado operado há 20 dias. Houve um desaparecimento completo das fibras nervosas.

Aumento: \pm 190X.

Quadro VIII - Polpas dentais coradas pelo OTAN, antes do tratamento pelo Hidróxido de Sódio (Legenda das fotos na página oposta).

Legenda das fotos do Quadro IX

Fig. 34 - Feixe de fibras nervosas de uma polpa normal (lado controle).

A secção foi prēviamente tratada pelo NaOH (hidrōxido de sōdio), sendo posteriormente corada pelo OTAN.

Aumento: ± 190X

Fig. 35 - Fibra nervosa de uma polpa dental do lado operado hã 3 dias. As alterações morfolōgicas sã**o** bem evidentes neste perīodo.

Secção prēviamente tratada pelo NaOH, e corada pelo OTAN.

Aumento: ± 190X

Fig. 36 - Polpa dental do lado operado hã 10 dias.

O tratamento pelo NaOH antes da coloraça**o** pelo OTAN, removeu quase todo o material OTAN-positivo.

Aumento: ± 190X

Fig. 37 - Lado operado hã 60 dias.

A secção foi corada pelo OTAN ap**o**s tratamento prēvio pelo NaOH.

Aumento: ± 190X.

Quadro IX - Polpas dentais coradas pelo OTAN, após o tratamento pelo Hidróxido de Sódio (Legenda das fotos na página oposta).

revelaram a presença de qualquer fibra nervosa. A figura 33 mostra claramente que aos 20 dias, nenhuma estrutura nervosa da polpa se cora pelo OTAN. Da mesma forma, a figura 37, mostra o tecido pulpar 60 dias após a transecção, não havendo qualquer sinal de material NaOH-OTAN positivo.

3. BIRREFRINGÊNCIA

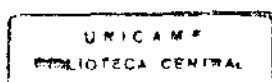
a) Lado Controle

As polpas do lado controle quando observadas ao microscópio de polarização permitiram notar uma intensa birrefringência das fibras nervosas (Fig. 38 e 39). Estas figuras mostram o aspecto típico de uma polpa, onde as fibras nervosas exibem uma birrefringência bem mais intensa que os feixes de colágeno. A introdução do compensador do gesso, vermelho de primeira ordem, entre o objeto e o analisador permitiu distinguir, no 1º quadrante, a birrefringência positiva do colágeno contrastando com a birrefringência negativa da fibra nervosa.

Nas secções tratadas pela Acetona houve apenas uma discreta diminuição da intensidade da birrefringência (Fig. 46). Em todas as secções, a comparação das secções antes e após o tratamento pela Acetona, permitiu verificar que embora discreta, a diminuição da birrefringência era perfeitamente observável sem medições mais detalhadas. Diferentemente da Acetona, o Clorofórmio-Metanol-Ácido Clorídrico eliminou completamente a birrefringência dessas fibras nervosas normais (Fig.47).

b) Lado Operado

No lado operado, a microscopia de polarização



permitiu detectar, através da birrefringência, diferentes estágios da degeneração das fibras nervosas (Fig. 40, 41, 42 e 43). Aos 3 dias os feixes de fibras nervosas já mostravam áreas irregulares, com perda da continuidade das fibras e o aparecimento de algumas poucas "cruzes de polarização" ou "cruz de Malta" (Fig. 40 e 41).

Aos 10 dias, a estruturação morfológica da fibra desaparecia por completo, ficando apenas numerosos glóbulos de material intensamente birrefringente, exibindo a cruz de polarização (Fig. 42 e 43). Ao lado dessas alterações estruturais da fibra nervosa, o colágeno mantinha inalterável a sua birrefringência (Fig. 43). Aos 20 dias, as fibras nervosas desapareciam por completo restando apenas a birrefringência do colágeno (Fig. 44 e 45).

Aos 30 e 60 dias repetiam-se os detalhes encontrados 20 dias após a transecção. O tratamento das secções por Acetona, permitiu verificar que aos 3 e 10 dias, embora ocorresse uma acentuada diminuição da birrefringência, ainda ficavam restos de fibras exibindo birrefringência. Aos 20, 30 e 60 dias desaparecia completamente qualquer vestígio de nervos. O tratamento pelo Clorofórmio-Metanol-Ácido Clorídrico fez desaparecer completamente a birrefringência das fibras nervosas, restando apenas o colágeno birrefringente. As figuras 44, 45 e 47 mostram o aspecto que o tecido pulpar assume depois de 20 dias de transecção, sendo válido o detalhe, tanto para os cortes tratados como para cortes não tratados.

Legenda das fotos do Quadro X

Fig. 38 - Birrefringência do Tecido Pulpar Normal. Um feixe de fibras nervosas intensamente birrefringente aparece ao lado de feixes de fibras colágenas. Cortes por/ congelação, com 10 microns de espessura, montados sem coloração.

Aumento: \pm 380X

Fig. 39 - Outro aspecto da birrefringência de fibras nervosas normais (lado controle). Ao nível dos nódulos de Ranvier a fibra não é birrefringente dando um aspecto de segmentação.

Aumento: \pm 480X

Fig. 40 - Feixe de fibras nervosas da polpa dental do lado operado há 3 dias. A fotomicrografia mostra o aspecto / segmentado das fibras, com o aparecimento de glóbulos de material birrefringente exibindo a cruz de polarização.

Aumento: \pm 380X

Fig. 41 - Feixe de fibras nervosas de uma polpa do lado operado há 3 dias, observado ao microscópio de polarização. Pequenos fragmentos de fibras nervosas aparecem ao lado de glóbulos de material birrefringente exibindo a cruz de polarização.

Aumento: \pm 380X.

Quadro X - Birrefringência do tecido pulpar, antes do tratamento pela Acetona ou pelo Clorofórmio-Metanol-Ácido Clorídrico (Legenda das fotos na página oposta).

Legenda das fotos do Quadro XI

Fig. 42 - Secção longitudinal de tecido pulpar, do lado operado há 10 dias, observado ao microscópio de polarização. Fibras colágenas birrefringentes são abundantes ao lado de numerosos glóbulos de material birrefringente. A este estágio não mais se nota o aspecto fibrilar do nervo.

Aumento: \pm 380X.

Fig. 43 - Outra secção de tecido pulpar, 10 dias após a transecção do nervo alveolar. Ao lado de feixes de colágeno pode-se notar a presença de material birrefringente (restos de fibras nervosas) exibindo a Cruz de Malta ou Cruz de Polarização.

Aumento: \pm 380X.

Fig. 44 - Secção de tecido pulpar, 20 dias após a transecção do nervo alveolar, observado ao microscópio de polarização. Apenas aparece a birrefringência do colágeno. Não se nota nesta polpa, a birrefringência de fibras nervosas.

Aumento: \pm 480X.

Fig. 45 - Outro detalhe de uma polpa do lado operado há mais de 20 dias, quando observada ao microscópio de polarização. O aspecto é o mesmo aos 20, 30 ou 60 dias. Não há fibras nervosas birrefringentes.

Aumento: \pm 480X.

Quadro XI - Birrefringência do tecido pulpar antes do tratamento pela Acetona ou pelo Clorofórmio-Metanol-Ácido Clorídrico (Legenda das fotos na página oposta).

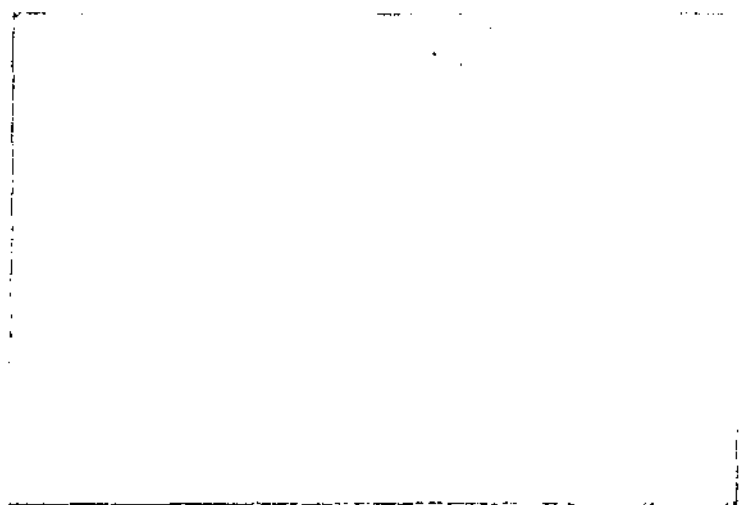


Fig. 46 - Polpa normal, tratada pela Acetona. Apesar do tratamento, as fibras nervosas continuam a exibir uma intensa birrefringência, quando observadas ao microscópio de polarização.

Aumento: ± 370 X

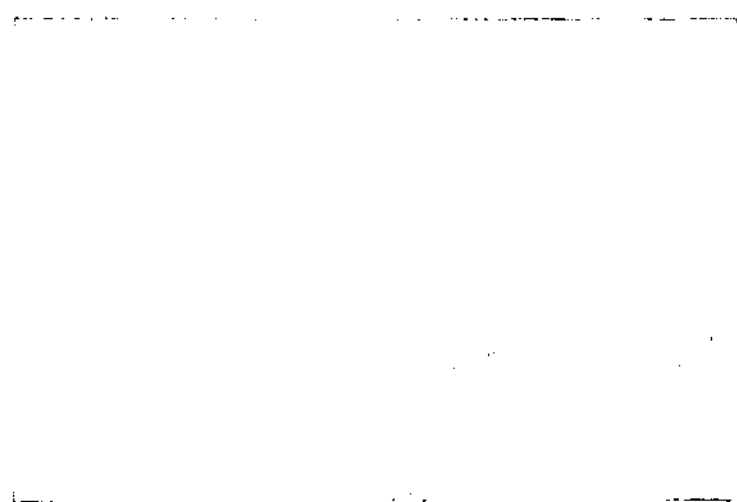


Fig. 47 - Aspecto típico evidenciado ao microscópio de polarização pelas secções tratadas pelo Clorofórmio-Metanol-Ácido Clorídrico. Desaparece completamente a birrefringência da fibra nervosa, restando sōmente a do colāgeno.

4. ESTUDO MORFOLÓGICO

4.1. IMPREGNAÇÃO PELA PRATA (MÉTODO DE CASTRO)

a) Lado Controle

As polpas impregnadas pela prata, segundo o método de Castro, mostraram detalhes importantes da morfologia da inervação pulpar. No lado controle pode-se observar, em todas as secções, a presença de fibras nervosas, de espessuras variáveis (Fig. 48, 50, 52, 54). Este método de impregnação argêntica dá à fibra nervosa um destaque muito grande, permitindo observar com clareza que as fibras normais apresentam uniformidade estrutural, sem solução de continuidade, (Fig. 52 e 54). Penetrando pelo forame apical da polpa, como feixes mais ou menos espessos, essas fibras ramificam-se na porção coronária da polpa sendo possível notar na periferia coronária da polpa delicadas fibras nervosas isoladas (Fig. 50).

b) Lado Operado

No lado operado, pode-se observar que aos 3 dias, já havia uma perda da homogeneidade de impregnação da fibra pela prata, com formações irregulares e descontínuas (Fig. 49). Diferentemente da morfologia observada através dos métodos para lipídios, a segmentação da fibra assume um aspecto diferente. Aos 10 dias, acentua-se esta desorganização das fibras com o desaparecimento de grande parte da estrutura que se impregnava pela prata (Fig. 51). Todo o feixe nervoso fica reduzido a alguns amontoados de material impregnado pela prata, tornando difícil

Legenda das fotos do Quadro XII

Fig. 48 - Secção de uma polpa normal, impregnada pela prata. Fibras isoladas ou agrupadas são bem evidenciadas pela prata.

Aumento: \pm 480X.

Fig. 49 - Fibras nervosas da polpa do lado operado 3 dias após a transecção do nervo. A segmentação da fibra evidenciada pela prata é um aspecto típico deste estágio.

Aumento: \pm 480X.

Fig. 50 - Secção de uma polpa normal, nas proximidades da camada odontoblástica. Feixes de fibras e fibras isoladas de delicadas dimensões podem ser evidenciadas pela prata.

Aumento: \pm 480X.

Fig. 51 - Secção de uma polpa do lado onde o nervo alveolar foi seccionado há 10 dias. Apenas fragmentos de material impregnado pela prata são encontrados neste estágio / da degeneração da fibra.

Aumento: \pm 480X.

Quadro XII - Polpas dentais impregnadas pela
prata (Método de Castro).
(Legenda das fotos na página oposta).

Legenda das fotos do Quadro XIII

Fig. 52 - Secção longitudinal de uma polpa normal. A impregnação pela prata evidencia muito bem a morfologia da fibra.

Aumento: \pm 480X.

Fig. 53 - Secção do tecido pulpar do lado onde foi feita a transecção do nervo alveolar há 20 dias. Não mais aparecem fibras coradas pela prata.

Aumento: \pm 480X.

Fig. 54 - Outro detalhe da impregnação a prata de fibras nervosas do lado não operado. A continuidade estrutural é bastante característica.

Aumento: \pm 480X.

Fig. 55 - Esta fotomicrografia evidencia detalhes de uma polpa do lado em que o nervo alveolar sofreu transecção há 60 dias. O aspecto é o mesmo observado aos 20 ou 30 dias, isto é, ausência de fibras nervosas.

Aumento: \pm 480X.

Quadro XIII - Polpas dentais impregnadas pela
prata (Método de Castro).
(Legenda das fotos na página oposta)

perceber a sua organização fascicular. Em algumas áreas, pode-se notar ao redor dessas massas coradas pela prata, um halo claro, possivelmente restos lipídicos que foram removidos pelo processamento laboratorial usado. Aos 20, 30 e 60 dias, houve um desaparecimento completo das fibras nervosas que se coravam pela prata (Fig. 53 e 55).

4.2. FIBRAS NERVOSAS OBSERVADAS EM SECÇÕES DE 0,5 MICRON CORADAS COM AZUL DE METILENO

a) Lado Controle

Os cortes, finos (0,5 micron) corados com Azul de Metileno permitiram notar uma certa uniformidade morfológica das polpas controle, apesar das variações possíveis entre um animal e outro. (Fig. 56, 58 e 62).

Na porção radicular da polpa as fibras nervosas, predominantemente mielinizadas, formavam feixes espessos, enquanto que na porção coronária os feixes eram mais delicados, sendo comum observar-se fibras isoladas. Envolvendo o feixe nervoso, notou-se uma discreta condensação de fibras colágenas, as quais se insinuam por entre as fibras (Fig. 60).

Tanto as secções longitudinais como as transversais permitem observar um contraste acentuado entre a coloração homogênea e intensa da mielina e a pálida coloração do axoplasma (Fig. 58, 60 e 62).

São facilmente observáveis numerosos núcleos de células neurilemais (células de Schwann), sendo difícil contudo, detectar os nódulos de Ranvier.

b) Lado Operado

Após a transecção do nervo, o primeiro período de observação foi de 3 dias. A este tempo, já eram notáveis profundas alterações morfológicas, não só da mielina mas também do axoplasma (Fig. 57). Nota-se uma fragmentação das fibras nervosas, que parecem assumir um aspecto entumescido, bastante comum já aos 3 dias. Algumas fibras parecem se alterar mais intensamente que outras, ocorrendo também modificações celulares, especialmente das células neurilemais, e de macrófagos (Fig. 57). Embora conservassem ainda o aspecto fascicular, as fibras apareciam segmentadas e com alterações da bainha de mielina, que se corava de maneira irregular.

Aos 10 dias, intensificavam-se os processos degenerativos (Fig. 59). Dentro de um mesmo feixe os aspectos morfológicos das fibras em degeneração eram profundamente heterogêneos, aparecendo fibras completamente desintegradas e sem coloração, ao lado de fibras formando massas amorfas intensamente coradas pelo Azul de Metileno. A fig. 57 evidencia claramente as diferenças de intensidade da degeneração entre uma fibra e outra 10 dias após a transecção.

Aos 20 dias, não mais são notados os aspectos morfológicos das fibras nervosas. Nem mesmo foi observado a presença de um tecido cicatricial no local onde havia fibras nervosas (Fig. 61). Aos 30 dias os aspectos morfológicos não diferem daqueles observados aos 20 dias, o mesmo acontecendo com a polpa de 60 dias (Fig. 63). A partir dos 20 dias, o tecido pulpar, embora completamente denervado, mostrava todas as demais caracterís-

Legenda das fotos do Quadro XIV

Fig. 56 - Secção de uma polpa normal, incluída em Epon, seccionada com 0,5 mícron de espessura e corada com Azul de Metileno.

Feixes de fibras são bem evidenciados, mostrando a mielina bem uniforme envolvendo o axônio.

Aumento: \pm 380X.

Fig. 57 - Detalhe de um feixe nervoso de uma polpa do lado operado, 3 dias após a transecção. Segmentação, varicosidades e falta de uniformidade na coloração são aspectos típicos deste estágio.

Aumento: \pm 480X.

Fig. 58 - Secção de uma polpa, do lado não operado, mostrando feixes de fibras muito bem corados pelo Azul de Metileno.

Aumento: \pm 480X.

Fig. 59 - Secção de uma polpa do lado onde a transecção foi feita há 10 dias.

Diferentes estágios de degeneração e numerosos fagócitos podem ser vistos nesta fotomicrografia.

Aumento: \pm 480X.

Quadro XIV - Cortes de 0,5 mícron de pólpá dental,
corada com Azul de Metileno.
(Legenda das fotos na página oposta).

Legenda das fotos do Quadro XV

Fig. 60 - Outro detalhe de uma polpa normal, mostrando a uniformidade estrutural e tintorial das fibras nervosas e colágenas. Secção de 0,5 mícron, corada pelo Azul de Metileno.

Aumento: ± 480X.

Fig. 61 - Polpa Dental 20 dias após a transecção, lado operado. Apenas um tecido conjuntivo normal, com numerosos macrófagos e fibroblastos.

Aumento: ± 480X.

Fig. 62 - Outro detalhe de uma polpa normal. Fibras nervosas / isoladas ou em feixes são encontradas em todo o tecido pulpar.

Aumento: ± 480X.

Fig. 63 - Uma visão de uma área maior, mostrando a irrigação e a celularidade de uma polpa do lado em que o Nervo alveolar inferior sofreu transecção há 60 dias.

Aumento: ± 300X.

Quadro XV - Corte de 0,5 mícron de polpa dental
corada com Azul de Metileno..
(Legenda das fotos na pãgina oposta)

ticas de um tecido conjuntivo normal, aparecendo apenas em número maior de células fagocitárias (Fig. 61 e 63).

As fibras colágenas não evidenciavam qualquer alteração, nem são observáveis modificações nos odontoblastos, fibroblastos e células mesenquimais indiferenciadas. Uma avaliação mais cuidadosa das alterações vasculares não foi feita. Embora pudesse haver ocorrido alterações nas paredes e no diâmetro dos vasos, não houve preocupação, neste trabalho, de analisá-las.

5. MICROSCOPIA ELETRÔNICA

a) Lado controle

Além das fibras nervosas mielínicas e amielínicas, aparecem ainda na polpa os vasos sanguíneos, os fibroblastos, histiócitos e células mesenquimais indiferenciadas. Grande quantidade de fibras colágenas se insinua por entre as células, nervos e vasos. Com relação às fibras nervosas, mielínicas, pode-se notar que apesar das variações normais de espessura entre uma e outra (Fig. 64), existe um padrão morfológico mais ou menos constante.

As secções transversais permitem observar uma baínha de mielina uniformemente corada, com sua estruturação característica em camadas concêntricas. Perifêricamente a esta baínha de mielina aparece, de maneira irregular, citoplasma de células neurilemais ou células de Schwann. (Apesar da tendência atual em nomenclatura histológica, de se dar preferência ao

termo "célula neurilemal" em detrimento da denominação "célula de Schwann" neste trabalho os dois termos serão usados indiscriminadamente).

As bainhas de mielina, com as variações naturais de espessura de uma fibra a outra, envolvem o axoplasma, onde / são observáveis os microtúbulos citoplasmáticos e os neurofilamentos, algumas vesículas, algumas poucas mitocôndrias e algumas organelas heterogêneas, bem delimitadas por uma membrana (provavelmente lisossomas). As fibras nervosas amielínicas são mais finas e encontradas com frequência entre as fibras mielinizadas. Geralmente, de diâmetros variáveis, estão agrupadas e são envolvidas, aos feixes por uma membrana bem definida. Estas fibras, tanto mielínicas, como amielínicas, do tecido pulpar, em bora formem feixes, não chegam a apresentar um envoltório fibroso típico. Nos feixes mais compactos, encontrados na porção ra dicular, ainda se pode observar uma certa condensação de fibras colágenas, tanto paralelas como perpendicularmente dispostas ao longo das fibras nervosas, mas na porção coronária, esta condensação não existe, aparecendo uma quantidade maior de fibras colágenas insinuadas frouxamente no meio das fibras nervosas (Fig. 65).

b) Lado Operado

Profundas alterações das fibras nervosas do lado operado foram observadas ao microscópio eletrônico. Aos 3 dias, já são notáveis algumas alterações, não sô da mielina, mas também do axoplasma. Algumas fibras evidenciaram alterações /

muito mais intensas que outras. A figura 68 mostra uma área do tecido pulpar onde as fibras mostram diferentes estágios de degeneração nesta mesma figura, assim como na 66, aparecem fibras onde a bainha de mielina ainda preserva detalhes de sua estrutura lamelar espiralada mostrando contudo, na sua parte interna uma desorganização de algumas das suas camadas.

Pode-se também observar no axoplasma os estágios iniciais de degeneração. Em outras áreas, como na figura 67, - aparecem alterações bem mais acentuadas, com o desaparecimento completo do aspecto lamelar da mielina em algumas fibras, enquanto em outras, esta mielina forma corpos densos compactos, de aspecto fibrilar CDC. Como característica comum, pode-se notar / uma contração do axoplasma, com formação no seu interior de corpos densos membranosos (Fig. 66, 67 e 68).

Aos 10 dias, os aspectos degenerativos das fibras nervosas tornam-se bem mais acentuados. Fragmentos de mielina são numerosos e frequentes no interior de macrófagos e de células de Schwann, formando massas amorfas ou corpos densos de aspecto fibrilar (Fig. 69). No meio destas fibras em degeneração são observáveis numerosos núcleos de células, provavelmente células de Schwann ou macrófagos (Fig. 69 e 70).

Os aspectos degenerativos tanto da mielina como do axoplasma variam de uma fibra para outra, sendo que muitos dos debris resultantes desta degeneração são fagocitados pela própria célula de Schwann. Aos 20 dias já não mais são observadas fibras nervosas no meio do tecido pulpar. A polpa mostra / os caracteres normais, inclusive da sua rede vascular, como evidenciado pela figura 71.

Apenas aparecem numerosos macrófagos contendo no seu interior restos de fibras, tanto massas mielínicas (Fig. 72) como fragmentos de axoplasma. Parece haver um discreto aumento do número de células de Schwann e de macrófagos, ao lado do desaparecimento completo de fibras nervosas. Aos 30 dias, (Fig. 73 e 74) são observáveis os mesmos aspectos encontrados nas polpas/ de 20 dias, isto é, um tecido pulpar com todas as características normais exceto, pela falta de fibras nervosas (Fig. 73). Fibroblastos e fibras colágenas (Fig. 74) continuam sendo os elementos predominantes.

Aos 60 dias ainda são encontrados na polpa macrófagos com o citoplasma cheio de debris mielínicos, não se observando nenhuma evidência de fibras nervosas. A este estágio não se constatou no tecido conjuntivo pulpar nenhuma evidência de regeneração nervosa. Os aspectos evidenciados ao M.E. são exatamente aqueles observados aos 30 dias.

Legenda da figura 64

Eletron-micrografia de uma polpa normal, evidenciando a presença de fibras colágenas(FC) insinuadas no meio de fibras nervosas mielínicas e amielínicas. Além da es pessa membrana de mielina(MM) é bem evidente o axoplasma(AX) com todos os seus componentes uniformemente dis tribuídos. Aparece ainda um conjunto de fibras nervosas amielínicas(FA) com o axoplasma idêntico às fibras miel inizadas.

Aumento aproximado:11.000 - (EM.10-Zeiss)

Figura 64.

Legenda da figura 65

Eletron-micrografia de uma outra polpa dental normal (lado controle), corada com acetato de uranila e citrato de chumbo. A figura mostra duas fibras mielinizadas e um conjunto de fibras amielínicas em meio a numerosas fibras colágenas, dispostas em diferentes direções. Envolvendo as fibras mielinizadas aparece uma pequena quantidade de citoplasma das células de Schwann. Pode-se observar que as diferentes estruturas do axoplasma (neurófilamentos, mitocôndrias, vesículas e corpos densos) aparecem bem preservadas, tanto nas fibras mielínicas como nas amielínicas.

Aumento aproximado: 24.000 X - (EM.10 - Zeiss)

Figura 65.

Legenda das figuras 66 e 67

Fig.66-Secção de uma polpa dental do lado em que o nervo alveolar inferior foi seccionado há 3 dias. Fibras mielinizadas com aspectos morfológicos variáveis podem ser notadas.No canto superior esquerdo aparece uma célula de Schwann(CS) envolvendo uma fibra cujo axoplasma evidencia condensações irregulares de material axoplasmático.Ao lado desta célula aparece uma outra fibra com uma membrana de mielina espessa.

No alto à direita aparece uma fibra maior em que o axoplasma perdeu suas características normais,mostrando um acúmulo de massas densas.

Aumento aproximado: 7.000x - (EM.10 -Zeiss)

Fig.67- Outra secção de uma polpa dental,3 dias após a transecção do nervo alveolar inferior.Fibras nervosas em diferentes estágios de degeneração estão entremeadas por fibras colágenas.Ao centro aparece uma célula de Schwann (CS) envolvendo uma fibra mielinizada onde são evidentes as alterações do axoplasma e da mielina.

Aumento aproximado: 9.000X- (EM.10 -Zeiss)

Figuras 66 e 67.

Legenda da figura 68

Eletron-micrografia de uma polpa dental do lado em que o nervo alveolar inferior foi seccionado há 3 dias. Um conjunto de fibras mielinizadas mostra claramente os estágios diferentes de degeneração das fibras nervosas de uma área. No alto à esquerda aparece uma fibra com o axoplasma (AX) e a mielina relativamente bem preservadas. Mais ao centro aparece um corpo membranoso denso (CD) e uma outra fibra mielinizada em adiantado estágio de degeneração. Na parte inferior da foto, um material citoplástico com numerosos vacúolos e organelas (mitocôndrias?), envolvendo 2 fibras cujas alterações mostram aspectos diferentes.

Aumento aproximado: 24.000x - (EM.10 - Zeiss)

Figura 68.

Legendas das figuras 69 e 70

Fig.69- Eletron-micrografia de uma polpa dental 10 dias após a transecção do nervo alveolar.

No alto da figura aparece uma célula de Schwann(CS) tendo no seu citoplasma um corpo denso membranoso(CD). Na parte inferior desta mesma figura aparecem restos de mielina envolvidos por citoplasma,provavelmente de um macrófago(MC).

Aumento aproximado: 5.000X -(EM.10 -Zeiss)

Fig.70- Detalhe maior da figura anterior mostrando que apesar do avançado estágio de degeneração de muitas fibras,algumas ainda preservam a mielina relativamente bem estruturada,podendo-se ainda perceber a disposição concêntrica espiralar regularmente disposta da mielina.

Aumento aproximado: 21.000X - (EM.10 - Zeiss)

Figuras 69 e 70.

Legenda das figuras 71 e 72

Fig.71- Polpa dental do lado operado há 20 dias, mostrando um detalhe da rede vascular sem maiores alterações. Na luz do vaso aparecem algumas plaquetas e uma hemácea. Além das células endoteliais a figura mostra ainda um pericito. Envolvendo o vaso (metarteríola?) aparecem fibras colágenas em diferentes direções.
Aumento aproximado: 3.000X - (EM.10 -Zeiss)

Fig.72- Na mesma polpa operada há 20 dias, a figura mostra um macrófago contendo no seu citoplasma restos de fibras nervosas (especialmente mielina) fagocitados. Alguns feixes de fibras colágenas cortadas transversalmente podem ser vistos.
Aumento aproximado: 4.200X (EM.10 -Zeiss)

Figuras 71 e 72.

Legenda das figuras 73 e 74

Fig.73- Eletron-micrografia da polpa dental do lado em que foi feita a transecção do nervo alveolar há 30 dias. A figura mostra o aspecto relativamente normal da polpa, com grande quantidade de fibras colágenas e fibroblastos. Aparecem ainda prolongamentos citoplasmáticos de fibroblastos e um pericito.
Aumento aproximado: 3.000X -(EM. 10 - Zeiss)

Fig.74- Outro aspecto de uma polpa operada há 30 dias. Grande quantidade de fibras colágenas ao redor de um macrófago contendo ainda no seu citoplasma alguns debris mielínicos.
Aumento aproximado: 12.500X -(EM.10 -Zeiss)

Figuras 73 e 74.

DISCUSSÃO

1. Morfologia:

A polpa dental, vulgarmente chamada "nervo do dente" possui aspectos histo-morfológicos que parecem estar relacionados de alguma forma com suas alterações fisiopatológicas e com suas manifestações clínicas. O elevado número de fibras nervosas mielínicas e amielínicas e o envoltório dentinário que a limita, são características que devem diferenciar as reações pulpares, daquelas encontradas em outros territórios conjuntivos. As alterações morfológicas observadas nesta pesquisa revelaram que a degeneração das fibras nervosas pulpares, após a transecção, não diferem, em essência, dos padrões clássicos descritos para as fibras nervosas de outras regiões, mas apresenta detalhes que parecem inerentes ao seu grau de diferenciação, ou à sua estruturação.

É um fato repetidamente comprovado que a transecção de uma fibra nervosa qualquer, leva, invariavelmente a um processo degenerativo de todo o segmento distal desta fibra, provocando, ainda, alterações mais ou menos extensas no segmento proximal (Noback & Reilly, 1956; McMinn, 1969; Florey, 1970; Junqueira & Carneiro, 1974). Por outro lado, tem sido demonstrado também detalhes da capacidade regenerativa deste segmento distal, quando o nervo é seccionado (Erhart, 1962; Thomas & Jones, 1967; Machado, 1974).

No tecido pulpar, as informações relativas às alterações decorrentes da transecção do suprimento nervoso, são escas

sas e desencontradas (Butcher & Taylor, 1951; Avery et alii, 1971; Torneck et alii, 1972), tornando difícil a discussão dos resultados mostrados na presente pesquisa. De qualquer forma, a utilização de diferentes métodos de preparo e coloração das secções permitiram observar que durante os primeiros três dias após a transecção, as fibras nervosas apresentavam-se entumescidas, com alterações da sua uniformidade tintorial, início da fragmentação e formação de massas arredondadas semelhantes às contas de um rosário (varicosidades).

Comparando-se os aspectos observados nas figuras (3, 5, 15, 31, 39 e 57) do lado operado, com aquelas do lado controle (2, 14, 38 e 56), pode-se notar que as alterações morfológicas já são bem significativas aos três dias. A conjugação dos resultados das técnicas de coloração pelo Azul de Metileno, da impregnação pela prata, da coloração pelo Sudan Black, pelo OTAN e pela Hemateína Ácida, permitiram observar que aos três dias, as alterações morfológicas são variáveis de uma fibra para outra, sendo evidente que as fibras mielinizadas mais finas alteram-se mais intensamente que as fibras mais grossas.

Estas observações coincidem com as de Weddell & Glees (1974) feitas em nervos cutâneos de orelhas de coelho, usando técnica intravital com Azul de Metileno. Em polpas humanas inflamadas, obtidas de dentes com cárie, Almeida & Bozzo (1973) encontraram alterações morfológicas semelhantes às notadas no presente trabalho, tendo esses autores, relacionado aquelas alterações com a evolução do processo inflamatório. Liebman (1973) afirma que existem 3 fatores envolvidos na produção da dor pul-

par, sendo um desses fatores o equilíbrio de atividades nas fibras grossas e finas, relacionando esta diferença de espessura com o comportamento da fibra na transmissão dos estímulos.

É possível que as dificuldades de se estabelecer uma correta relação entre a sintomatologia clínica e o diagnóstico histopatológico resultem exatamente do estágio de degeneração de um e de outro tipo de fibra. Aos 10 dias, as alterações morfológicas são gritantes. Apenas algumas fibras, geralmente espassas, totalmente desorganizadas, permitem perceber o adiantado estágio de degeneração. Os resultados encontrados através da coloração pelo Sudan (Fig. 7), pelo Azul de Metileno (Fig. 59) pela prata (Fig. 41) e pela Hemateína Ácida (Fig. 17) são bastante semelhantes e mostram que nesta fase, o feixe nervoso já está quase totalmente substituído por tecido conjuntivo. Aos 20 dias, a polpa já aparece completamente denervada, não se constatando por nenhuma das técnicas de microscopia de luz, a presença de fibras nervosas (Fig. 11, 19, 33, 43 e 61). Aos 30 e 60 dias, repetem-se os detalhes encontrados aos 20 dias, isto é, ausência de nervos na polpa, como se pode notar pelas figuras 13, 21, 37, 45 e 63.

As alterações morfológicas evidenciadas, através de diferentes métodos de estudo indicam que embora exista um desaparecimento completo das fibras nervosas, a polpa dental se mantém como um tecido vivo, tendo já sido demonstrado por Torneck et alii (1972), que a deposição de dentina não se altera substancialmente. As possíveis alterações vasculares não conduziram a um comprometimento da vitalidade, não tendo sido constatada

do, em nenhum estágio da degeneração nervosa, um quadro indicativo de reação inflamatória. Isto permitiria excluir a necessidade de se fazer tratamento endodôntico dos possíveis dentes comprometidos por uma secção accidental ou proposital do nervo alveolar.

Estas alterações morfológicas das fibras nervosas detectadas através de métodos relativamente grosseiros e carentes de maior refinamento, embora não permitissem verificar se as alterações se estabelecem inicialmente no axoplasma ou na mielina, permitiram por outro lado, observar que a degeneração nervosa na polpa ocorre numa sequência de estágios relativamente bem determinados, não implicando em maior comprometimento do resto do tecido pulpar. Até o final do período de estudo (60 dias) não se constatou, no tecido pulpar qualquer vestígio da regeneração da inervação. Fazendo-se então uma conjugação desses achados, pode-se dizer que o processo de degradação da fibra é bem significativo já nos primeiros dias e a comparação dos aspectos normais e alterados, permitem estabelecer um primeiro estágio da degradação, por volta do 3º dia. Por volta do 10º dia, já se pode notar que a degradação atinge um segundo estágio no qual apenas em algumas áreas ainda são encontrados restos de fibras em adiantado estágio de destruição, ao lado de intensa atividade de debridamento por células fagocitárias.

Restos de fibras coradas pela prata, pelo Sudan pela Hemateína ou pelo Azul de Metileno, lembram o local onde deve ter existido um feixe nervoso. Um 3º período pode ser estabelecido por volta do 20º dia, quando não mais são observáveis

quaisquer sinais de inervação pulpar. Outro evento significativo neste período é o número de macrófagos ainda presentes na área de degeneração das fibras.

A partir dos 20 dias, até aos 60, pouca coisa se altera do lado operado, pelo menos, no que tange à presença de fibras nervosas. Embora McMinn (1969) e Noback & Reilly (1956) ressaltem que os graus de alterações das fibras, sejam diferentes conforme as espécies, sendo mais rápida a degeneração nervosa em rato do que em macaco ou em gato, parece lógico imaginar que estes 3 estágios de alterações morfológicas sejam observáveis também na polpa humana, que possui uma estruturação semelhante à do cão. Nestes termos, parece viável, guardadas as devidas proporções, uma extrapolação desses achados morfológicos a outros animais, até mesmo ao homem.

2. Estudos Histoquímicos:

Sendo a polpa dental inervada por fibras predominantemente mielinizadas, a transecção do nervo dentário, determinou alterações das fibras nervosas pulpares, passíveis de serem avaliadas através de técnicas específicas para gorduras. Neste trabalho, procurou-se, por meios histoquímicos, avaliar algumas dessas alterações que as fibras nervosas sofrem.

No processo de degeneração das fibras nervosas, segundo Adams & Tuqan (1963), Noback & Montagna (1952), Noback & Reilly (1956), a bainha de mielina se fragmenta, na primeira semana, em finas partículas e grânulos lipídicos que tem no geral, as mesmas características dos lipídios da mielina normal embora possam aparecer partículas e grânulos corados de laranja pelo

Sudan IV e rosa pelo Azul do Nilo. Na segunda semana da desmielinização, os lipídios da mielina são quimicamente degradados, acusando um aumento principalmente em ésteres de colesterol, alterando-se as propriedades histoquímicas da bainha. Ao fazer o estudo histoquímico dos lipídios, normalmente surgem dois problemas: o primeiro é a falta de uniformidade na classificação dos lipídios; o segundo, resulta do fato dos lipídios serem mutuamente solúveis uns nos outros de tal forma que pequenas quantidades de um lipídio em particular podem ser mascarados tanto no aspecto físico como químico, pelo excesso de um lipídio de outro tipo, (Adams 1961). Mesmo assim, foi possível observar - na polpa dental, que com a degradação da mielina aparecem diferentes tipos de lipídios, ou lipídios derivados.

Na discussão dos resultados será usada a classificação de lipídios apresentada por Pearse (1968), que é mais simples e um pouco diferente daquela usada por Lison (1960) ou por Adams (1969).

a) Lado Controle (Fibras normais)

Na avaliação histoquímica das alterações das fibras nervosas da polpa, a conjugação de métodos de extração seletiva de lipídios permitiu identificar algumas das substâncias gordurosas presentes. Os resultados encontrados nas fibras do lado controle, portanto normais, mostraram que a bainha de mielina aparece uniformemente bem corada pelo Sudan Black, pelo OTAN e pela Hemateína ácida.

Apesar das considerações de Melcher (1969) sobre o Sudan Black como um método mais histofísico que histoquímico

(pois o Sudan se dissolve nos lipídios que cora) ele é aqui genericamente considerado como histoquímico, e serve para demonstrar, segundo Adams (1969), fosfolipídios e lipídios hidrófobos não saturados (triglicerídios, esterés de colesterol e ácidos graxos).

A coloração azulada (e não preta) assumida pelas fibras nervosas normais coradas pelo Sudan Black é indicativa da predominância de fosfolipídios, na estruturação da mielina / normal, aliás, fato sobejamente conhecido. O tratamento pela acetona a 4⁰C por 1 hora, embora não modificasse substancialmente a coloração azulada, provocou uma ligeira diminuição da sua intensidade.

Esta diminuição deve haver resultado da remoção pela acetona do colesterol existente normalmente na mielina, o que está de acôrdo com os achados de Adams & Bayliss (1968), de Pearse (1968), de Adams (1962) e de Wolman & Lerner (1960), que observaram estes mesmos detalhes em nervos ciáticos de ratos. Roozmond (1970) observou também em cérebro de rato, que o tratamento pela acetona a 4⁰C usada para extrair lipídios não polares, não alterou substancialmente a intensidade da coloração. A coloração vermelho-alaranjada observada nas fibras coradas pelo OTAN, resulta, segundo Pearse (1968), da formação de um quelato ("osmium-alfa-naphtylamine-chelate") que caracteriza lipídios hidrófilos insaturados, que no caso da mielina são lecitina, cefalina, esfingomiéline e cerebrosideo. Os resultados da presente pesquisa estão plenamente concordes com Pearse (1968) e com Adams (1969) que afirma que a reação vermelho-alaranjada

do OTAN resulta geralmente de fosfolipídios insaturados. É sabido que na mielina normal estes lipídios predominam.

Após o tratamento pelo NaOH foi observada uma variação significativa da coloração, o que permite supor que entre os fosfolipídios existentes na mielina exista uma predominância de esfingomielina (lipídio alcali-resistente). A presença de fosfolipídios como parte da mielina é um fato bastante conhecido, Bubs & Wolman (1962) deixam claro que estes fosfolipídios formam complexos com o colesterol. O tratamento pelo NaOH-OTAN promovendo uma hidrólise da lecitina e da cefalina (ligações sensíveis ao alcali), permite a evidenciação da esfingomielina, desde que a ligação amida entre suas cadeias de ácidos graxos e esfingosina resiste a este tratamento.

A permanência da coloração avermelhada das fibras nervosas normais permitiu confirmar a presença de esfingomielina na sua estruturação.

A coloração pela Hemateína ácida (Teste de Baker), apenas confirmou os resultados do OTAN e da sudanofilia. A coloração azul escura das fibras mielinizadas coradas pelo Teste de Baker se deve à presença de fosfolipídios, especialmente es fingomielina e lecitina. Embora o tratamento pelo Clorofórmio-Metanol-Ácido Clorídrico tivesse reduzido a intensidade da coloração, não impediu que uma parte da mielina reagisse positivamente à Hemateína.

Segundo Roozmond (1970) os proteolipídios clorofórmio-metanol-solúveis formam outro constituinte importante / da mielina, e talvez tenham sido os responsáveis pela diminui-

ção da coloração pela Hemateína após o tratamento com Clorofórmio-Metanol-Ácido Clorídrico.

a) Lado Operado (Fibras alteradas)

Os achados de três e dez dias após a transecção mostram propriedades histoquímicas diferentes daquelas observadas nas fibras normais.

As observações com o Sudan, mostram que aos três dias, a coloração das fibras em degeneração é bem mais intensa, e de tonalidade preta (em vez de azul), indicativa de que deve haver ocorrido uma diminuição de fosfolipídios e consequente / aumento de lipídios hidrófobos não saturados. Este fato está em consonância com os achados de Noback & Reilly (1956). Além disso, o tratamento das secções por acetona, diminuiu a intensidade de coloração das fibras de maneira muito mais significativa do que ocorre na fibra normal. Isto é plenamente explicável porque a Acetona sendo bastante efetiva para remover lipídios hidrófobos, não extrai os fosfolipídios, explicando assim esses achados. Aos dez dias, embora a tonalidade da coloração mostre exatamente os mesmos aspectos, a quantidade do material corado é menor, sendo que após o tratamento com Acetona apenas ficaram alguns poucos resíduos da fibra, coráveis pelo Sudan. Adams e Bayliss (1968) demonstraram que a acetona extrai todo o colesterol e ésteres de colesterol, mas não os lipídios polares. Isto significa que o material Sudanófilo restante seja, pelo menos em parte, lipídios polares, ou então, complexos lipoproteicos.

Aos 20 dias já não existe qualquer evidência de fibra nervosa, acontecendo o mesmo aos 30 e 60 dias. O Teste de Baker evidenciou também já aos três dias (Fig. 15) que existe na fibra uma diminuição de fosfolipídios, sendo que aos 10 dias (Fig. 17) esta quantidade está acentuadamente diminuída. O tratamento pelo Clorofórmio-Metanol-Ácido Clorídrico que diminui a coloração da fibra normal, reduziu também a intensidade da coloração das fibras aos três dias fazendo-a desaparecer por completo aos 10 dias.

O OTAN, confirmando os resultados do Sudan Black e do Teste de Baker, mostrou que aos três dias, as fibras assumiam uma coloração escura (Fig. 31) em vez da tonalidade avermelhada da fibra normal, (Fig. 30). Isto significa que os lipídios insaturados hidrófilos da fibra normal, deram lugar a lipídios insaturados hidrófobos, que por este método assumem uma coloração preta em vez de vermelha. Aos dez dias, houve uma diminuição acentuada dos lipídios em geral, mormente dos hidrófobos insaturados que predominavam por volta do 3º dia.

O tratamento pelo NaOH (Fig. 36) parece haver influído na coloração dos fragmentos de fibras ainda existentes aos 10 dias, reduzindo a quantidade de material corável, o que poderia significar que uma parte do material corado pelo OTAN, aos 10 dias, seria lipídio alcali-lábil (lecitina ou cefalina) enquanto o resíduo, que permanece corado seria esfingomiéline, (fosfolipídio alcali-resistente).

Os resultados histoquímicos aqui encontrados mostrando que já aos três dias ocorrem modificações químicas dos lipídios da mielina das fibras nervosas da polpa dental, embora estejam em desacordo com os achados de Noback e Montagna / (1952), Noback e Rilley (1956) e de Adams e Tuqan (1963), em nervo ciático de rato, confirmam plenamente o trabalho de Simon et alii (1969) que mostraram que a degeneração Walleriana é um processo sequencial, e que aos 4 dias já existe uma quantidade maior de colesterol e de esterés de colesterol do que na mielina normal, aumentando ainda mais esta quantidade aos 8 e 12/ dias.

Considerando que existe na polpa dental uma quantidade relativamente grande de fibras mielinizadas e que a mielina é fundamentalmente constituída de lipídios, as alterações dos lipídios detectados histoquimicamente, indubitavelmente estão relacionados com o processo de degeneração da fibra nervosa.

Em síntese, no processo gradual de degeneração da fibra nervosa pulpar, a partir do momento da secção do nervo, começa a ocorrer uma degradação química da bainha de mielina e do axoplasma, que resulta no aparecimento de lipídios mais simples. Estes lipídios, provávelmente ésteres de colesterol, colesterol e ácidos graxos em geral são bastante proeminentes / por volta do 3º dia, diminuindo por volta do 10º dia, quando a atividade fagocitária é bastante intensa, para desaparecerem / completamente por volta do 20º dia. Em face dos resultados obtidos através dessa conjugação de métodos histoquímicos, ficou

evidenciado que a fibra nervosa na polpa dental de cão sofre uma degradação, desaparecendo completamente antes do vigésimo dia da transecção e não evidenciando qualquer sinal de regeneração até o sexagésimo dia. Também não foram observados sinais de reação inflamatória em nenhuma das secções estudadas.

a) Lado Normal

A observação das fibras nervosas da polpa dental / em microscopia de polarização permitiu confirmar através de um método histofísico, muitos dos achados histoquímicos. Nas fibras normais, a intensa birrefringência negativa evidenciada pelas secções ao longo eixo das fibras nervosas (Fig. 38 e 39), - confirmam descrições já feitas por Setterfield & Sutton (1935) Noback & Montagna (1952), Bubis & Wolman (1962) e Bozzo & Almeida (1972).

Não existe nenhuma dúvida de que esta birrefringência da fibra nervosa seja devido a uma orientação molecular muito bem definida dos elementos estruturais da mielina, especialmente dos fosfolipídios e colesterol, conforme demonstraram - Bubis & Wolman (1962).

A observação cuidadosa da figura 39 permite verificar que ao nível dos nódulos de Ranvier, parece haver uma solução de continuidade da massa anisotrópica, exatamente porque / nesta área não existe mielina, e porque o axoplasma é isotrópico.

As secções tratadas pela acetona a 4°C, conforme / está evidenciado na figura 46, mostra que apesar de haver determinado uma diminuição na intensidade da birrefringência, a acetona não eliminou a birrefringência da fibra.

Este achado está plenamente concordante com os resultados da sudanofilia, onde, embora a acetona houvesse removido parte do material lipídico da mielina, não chegou a alterar significativamente a sua coloração

Desde que a acetona a 4^oC remove todo o colesterol da mielina, não removendo contudo, os fosfolipídios, conforme / demonstraram Bubis & Wolman (1962) e Adams & Bayliss (1968), é lógico afirmar-se que a discreta diminuição da birrefringência das fibras normais foi devido a uma remoção do colesterol da / mielina, em consequência do tratamento pela acetona.

b) Lado Operado

As alterações estruturais evidenciadas pela microscopia de polarização, nas fibras nervosas em degeneração já são bem evidente a partir do 3^o dia.

O aparecimento, ao longo da fibra de áreas não birrefringentes significa que já está ocorrendo uma perda da estrutura da mielina. O aparecimento de numerosos glóbulos de material birrefringente exibindo a cruz de polarização (Fig. 40), indica, segundo Lison (1960) a presença de ésteres de colesterol ou de fosfolipídios.

Tanto a sudanofilia como o Teste de Baker ou a reação do OTAN parecem confirmar estes achados, indicando que este aspecto da birrefringência resulta da presença de ésteres de colesterol e de fosfolipídios. O aumento dos glóbulos lipídicos exibindo a cruz de polarização, com diminuição de áreas sem a cruz de polarização parece indicar o aumento de ésteres de colesterol e de fosfolipídios (Fig. 42 e 43), resultante de degradação da mielina.

O tratamento pela acetona diminuindo acentuadamente a birrefringência aos 3 e 10 dias, mostra que do 3^o ao 10^o dia

vai ocorrendo uma diminuição relativa de fosfolipídios e aumento de esteres de colesterol. A partir do 20º dia sō restava na polpa a birrefringência do colágeno, não sendo possível observar nenhuma fibra nervosa.

Os aspectos gerais da birrefringência das fibras / nervosas normais e dos seus produtos de fragmentação sō exatamente coincidentes com aqueles detectados pelos métodos histoquímicos, permitindo maior segurança na interpretação de um e de / outro achado.

4. Microscopia Eletrônica

a) Lado Controle:

A microscopia eletrônica permitiu observar alguns detalhes importantes, tanto nas polpas normais como naquelas do lado operado.

Fibras nervosas mielinizadas isoladas, ou formando feixes sō encontradas em diferentes áreas da polpa, com espessuras variáveis (Fig. 64 e 65). Fibras amielínicas, embora em número menor, estão também presentes com o axoplasma evidenciando os mesmos aspectos das fibras mielinizadas (Fig. 64 e 65). Apesar das considerações de Schmitt (1959) sōbre a não existência de fibras nervosas amielínicas, uma vez que todas elas estão envoltas por uma membrana lipo-proteica idêntica à mielina, existe na polpa dental fibras que podem ser consideradas como amielínicas (Fig. 64 e 65).

b) Lado Operado

Os resultados mostram que aos 3 dias as fibras nervosas já estão alteradas, com comprometimento não só do axoplasma como também da mielina. O fato mais interessante a este estágio é que, ao lado destas fibras, com evidentes sinais de degeneração aparecem fibras nas quais tanto o axoplasma como a / mielina estão praticamente normais. Vial (1958) estudando as alterações iniciais no axoplasma, durante a degeneração Walleriana, observou, no nervo safeno de rato, que entre 24 e 48 horas após a secção do mesmo, todos os neurofilamentos desapareciam, e que possivelmente, o axoplasma sofreria uma transformação de gel a sol, com conseqüente fragmentação da fibra. Na figura 68 estes diferentes estágios da alteração axoplasmática podem ser observados. Paralelamente, a degeneração da mielina acompanha as alterações do axoplasma, parecendo existir, segundo Webster (1971), uma relação entre a segmentação da mielina e a presença de incisuras de Schmidt-Lantermann.

Estas variações do início e da extensão da degeneração das fibras nervosas mielinizadas foram também observadas em nervos ciáticos de ratos (Webster, 1962) e no nervo auricular de cobaia por O'Daly e Imaeda (1967).

Aos 10 dias, em conseqüência da intensificação dos processos degenerativos, evidenciados nas figuras 69 e 70, parece haver um aumento das células fagocitárias. A desintegração da mielina representada pelas formações ovoides no interior do citoplasma das células de Schwann (Fig. 69) sugere que o início da degeneração da mielina resulta de uma atividade da própria célula de Schwann, que acaba eliminando para fora do seu

citoplasma os restos da fibra. O aumento do número de macrófagos neste estágio justificaria este evento.

A partir do 10º dia, até o 20º provavelmente ocorreria um aumento da atividade fagocitária dos macrófagos, acompanhado por mitose das células de Schwann, fato observado por O'Daly e Imaeda (1967). Por volta do 20º dia, não mais são evidenciadas as fibras em degeneração, restando apenas macrófagos (Fig. 72) com seu citoplasma cheio de mielina. Ao redor dos pequenos vasos podem ser observados pericitos aumentados de volume (Fig. 71). A afirmação de O'Daly e Imaeda (1967) de que a eliminação dos componentes resultantes da desintegração dos nervos é executada principalmente por macrófagos, pareceu evidente no presente trabalho, e a figura 72 mostra um fagócito promovendo esta eliminação.

Aos 30 e 60 dias, nenhum evento de importância a não ser a diminuição do número de células fagocitárias. A figura 73 mostra que a este estágio apenas a ausência de fibras nervosas diferencia esta polpa, de uma polpa normal.

CONCLUSÕES

- 1 - A transecção do Nervo alveolar inferior provocou uma degeneração gradual das fibras nervosas pulpares, sem comprometer as demais estruturas histológicas da polpa dental.
- 2 - As alterações morfológicas das fibras nervosas são evidentes já aos três dias, tornando-se bem proeminentes por volta do décimo dia, quando a fibra perde completamente suas características estruturais.
- 3 - Vinte dias após a transecção já não existe evidência alguma de fibra nervosa na polpa, nem do material residual resultante da sua degeneração.
- 4 - A não ser o desaparecimento completo das fibras nervosas, / nenhum outro tipo de alteração foi observada depois do vigésimo dia. Até o sexagésimo dia não foi notado qualquer aspecto indicativo de regeneração de fibra nervosa.
- 5 - As alterações morfológicas variam de uma fibra para outra, e são acompanhadas por modificações histoquímicas e estruturais das fibras.
- 6 - A conjugação de diferentes técnicas histofísicas e histoquímicas permitiu confirmar a presença de fosfolipídios / especialmente esfingomielina na estruturação normal da mielina, e a sua gradual degradação nos períodos subsequentes à transecção do nervo.

- 7 - Os resultados histoquímicos mostraram que aos 3 dias já ocorre uma degradação da mielina, com diminuição dos lipídios hidrófilos insaturados e aumento dos lipídios saturados hidrófobos.
- 8 - Aos 10 dias, existe na área das fibras nervosas uma predominância de lipídios hidrófobos insaturados (provavelmente ésteres de colesterol, colesterol e ácidos graxos), os quais desaparecem completamente por volta do vigésimo dia.
- 9 - A birrefringência da fibra normal, modifica-se acentuadamente aos 3 e 10 dias, para desaparecer completamente aos 20 dias, acompanhando as alterações morfológicas e histoquímicas.
- 10 - As alterações do axoplasma parecem preceder as da mielina. Aos 3 dias, as alterações da mielina são menos intensas que do axoplasma, na maioria das fibras nervosas.

RESUMO

As alterações que as fibras nervosas da polpa dental de um cão sofrem após a transecção do Nervo alveolar inferior foram estudadas através de uma conjugação de métodos histoquímicos, histofísicos e ultraestruturais.

A transecção unilateral do Nervo dentário inferior / foi feita ao nível da língua da mandíbula, sendo as polpas retiradas para estudo após períodos de tempo que variaram de 3 a 60 dias.

O lado não operado serviu como controle. Os aspectos morfológicos das alterações foram observados em secções impregnadas pela prata, em cortes de 0,5 micron corados pelo Azul de Metileno, e em coloração pelo Sudan e pela Hemateína ácida. Através destas colorações foi possível observar que existe um estágio inicial, por volta do 3º dia, em que as fibras nervosas já estão bastante alteradas, com varicosidades e fragmentação. A degeneração vai se acentuando, sendo que aos 10 dias apenas restos de fibras podem ser observados. Aos 20 dias, a polpa está completamente denervada. Através das reações da Hemateína ácida, do tetróxido de ósmio, e da sudanofilia, conjugados com extrações seletivas foi possível observar que os fosfolipídios predominantes na mielina normal sofrem uma degradação, diminuindo paralelamente com o aumento de ésteres de colesterol, colesterol e ácidos graxos, até que aos 20 dias, nenhum deles é detectado na área. A partir dos 20 dias, as caracte

rísticas gerais da polpa não se alteram, sendo que até aos 60 dias nenhuma evidência de regeneração destas fibras nervosas / foi notada.

A microscopia eletrônica permitiu observar os detalhes morfológicos desta degradação, mostrando que numa mesma área, as fibras se alteram diferentemente, parecendo haver uma degeneração inicial mais acentuada do axoplasma que da mielina.

A análise da birrefringência das fibras nos diferentes estágios mostrou que as alterações morfológicas e histoquímicas determinam modificações estruturais das fibras nervosas.

Referencias Bibliográficas

- ADAMS, C.W.M.- Lipid histochemistry. Adv. Lipid Res. 7: 1-62, 1969.
- ADAMS, C.W.M.; BAYLISS O.B. - Histochemistry of myelin. VI - Solvent action of acetone on brain and other lipid-rich tissue. J. Histochem Cytochem. 16, 116-118, 1968.
- ADAMS, C.W.M.; TUQAN, N.A. - Histochemistry of Demyelination - Ann. Histochem. 8, 215-222, 1963.
- ALMEIDA, O.P.; BOZZO, L. - Morphology of the nerve fibers in both normal and inflamed human dental pulp. Acta anat. 84: 597-607, 1973.
- AVERY, J.K. - Structural elementos of the young normal human pulp. Oral Surg. 32: 113-125, 1971.
- AVERY, J.K.; RAPP. R. - An investigation of the mechanism of neural impulse trasmission in human teeth. Oral Surg. 12: 190-198, 1959.
- AVERY, J.K.; STRACHAN, K.S.; CORPRON R.E.; COX, C.F. - Morphological Studies of the Altered Pulp of the New Zealand White Rabbit after Resection of the Inferior Alveolar Nerve and/or the Superior Cervical Ganglion. Anat. Rec. 171: 495-508, 1971.
- BERNICH, S. - Effect of Aging on the Nerve Supply to Human Teeth. J. dent. Res. 46: 694-699, 1967.

BERNICK, S. - Vascular and Nerve changes associated with the healing of the human pulp. - in "The Biology of the Human Dental Pulp" Edited by Siskin, M. The C.V. Mosby Co. Saint Louis, 1973.

BOZZO, L.; ALMEIDA, O.P. - Birefringence, dichroism and lipid histochemistry of myelinated nerve fibres in normal and inflamed human dental pulp. Ann. Histochem. 17: 185-193, 1972.

BROWN, G.N.; KUPFER, SR; DARLINGTON, C.G. - Effects of inferior alveolar nerve severance on the eruption rate of the mandibular incisor in ten day old wistar albino rats. Oral Surg. 14: 1227-1255, 1961.

BUBIS, J.J.; WOLMAN, M. - Arrangement of cholesterol molecules in the myelin sheath. Nature, 21, 299, 1962.

BUTCHER, E.O.; A.C. TAYLOR - The effects of denervation and ischemia upon the teeth of monkey. J dent. Res. 30: 265-275, 1951.

CAHEN, P.; FRANK, R.M. - Electronmicroscopy of the normal human dental pulp. - Bull. Group Int. Rech. Sci Stomat. 13: 421-443, 1970.

CIRELI, E. - Electron microscopic study on the ultrastructure of the dental pulp. J. dent. Fac. Istanbul. 5: 5-22, 1971.

EDWARDS, L.F.; KITCHIN, P.D. - Does resection of the nerves supplying the mandible affect tooth development? J. dent. Res. 17: 115-124, 1938.

ERHART, E.A. - Sobre a existência de fibras nervosas íntegras no segmento distal de nervos com mais de seis meses de secção completa - Tese de Livre Docência Fac. de Med. de Ribeirão Preto, 1962.

FRANK, R.M. - Etude an microscope electronique de l'odontoblaste et du canalicule dentinaire humain. Arch. oral Biol. 11: 179-199, 1966.

FRANK, R.M.- Attachment sites between the odontoblast process and the intradental nerve fibre. Archs. oral Biol. 13: 833-834, 1968.

FRANK, R.M.; SAUVAGE, C; FRANK, P. - Morphological basis of dental sensivity. Int. dent. J. 22, 1-19, 1972.

FEARNHEAD, R.W.; LINDER, J.E. - Observations on the silver impregnation of nerve fibres in teeth - J. anat. 90: 228-235, 1956.

FLOREY, H.W. - General Pathology- 4 th ed - Philadelphia - W.B. Saunders Co, 1970.

HARRIS, R.; GRIFFIN, C.J. - Fine structure of nerve endings in the human dental pulp. Arch. oral. Biol. 13: 773-778, 1968.

HELD, A.J.; BAUD, C.A. - The innervation of dental organ. Oral Surg. 8: 1262-1269, 1955.

JUNQUEIRA, L.C.; Carneiro, J. - Histologia Básica - 3^a Ed. - Rio de Janeiro - Ed. Guanabara-Koogan - 1974.

- KING, J.D. - Dietary deficiency, nerve lesions and the dental tissue. J. Physiol. 88: 62-77, 1936.
- KUKLETOVA, M. - Non specific esterases and cholinesterases in the human dental pulp. Acta Histochem. 33: 119-127, 1969.
- KUKLETOVA, M.; ZAHRAKKA, J.; LUKAS, J. - Monoaminergic and cholinergic nerve fibers in the dental pulp. Histochemie 16: 154-158, 1968.
- LERANTH, C.; CSANYI, K. - Innervation of teeth. Acta morph. Acad. Sci. hung. 15: 391-399, 1967.
- LIEBMAN, F.M. - Pain and Pressure in the human pulp - in "The Biology of Human dental pulp" - Edited by M. Siskin. The C. V. Mosby Co. - Saint Louis, 1973.
- LISON, L. - Histochemie et cytochimie animales, 3 ed. Paris - Gauthier Villars, 1960, vol. 2.
- MACHADO, A.B.M. - Neuroanatomia Funcional- Atheneu S.A. - Rio de Janeiro, p. 82.
- MARTINELLI, C.; TOLEDO, O.A. - The innervation of human pulp polyps. - Bull. Tokyo dent. Coll. 11, 11-18, 1970.
- MATTHEWS, J.L.; DORMAN, H. L.; BISHOP, J.G. - Fine structures of the dental pulp. - J. dent. Res. 38: 940-946, 1959.
- MCMINN, R.M.H. - Tissue Repair - New York, Academic Press, 1969, p.171.

MELCHER, A.H. - Histologically demonstrable bound lipid apparently associated with relatively stable, mature collagen fibres. Gerontologia 15: 217-232, 1969.

MILLER, B.G. - Investigations of the influence of Vascularity and Innervation on tooth Resorption and Eruption. J. dent. Res. 36: 669-676, 1957.

NISHIJIMA, S.; IMANISHI, I.; MIYOSHI, S. - Changes of myelin sheath of myelinated nerves in human dental pulp. J. Osaka Univ. dent. Sch. 4: 37-40, 1964.

NISHIJIMA, S.; IMANISHI, I.; MIYOSHI, S. - Electron microscopy of myelinated and unmyelinated nerve fibers in human dental pulp. Arch. oral Biol. 11: 845-846, 1966.

NOBACK, C.R.; MONTAGNA, W. - Histochemical studies of the myelin sheath and its fragmentation products during Wallerian (secondary) degeneration. J. comp. Neurol. 97: 211-239, 1952.

NOBACK, C.R.; REILLY, J.A. - Myelin sheath during degeneration and regeneration - J. comp. Neurol. 105: 333-353, 1956.

O'DALY, J.A.; IMAEDA, T. - Electron Microscopic study of Wallerian Degeneration in Cutaneous Nerves Caused by Mechanical Injury. Lab. Invest. 17, 744-766, 1967.

O'DALY, J.A.; IMAEDA, T. - Ultrastructural alterations of cutaneous nerves in granuloma. Exp. mol. Path. 11: 123-138, 1969.

- PEARSE, A.G.E. - Histochemistry, theoretical and applied 3rd ed. Churchill London, 1968.
- PLACKOVA, A. - Pathologic changes in the innervation of the dental pulp during the carious process. J. dent. Res. 45: 62-65, 1966.
- POHTO, P.; ANTILA, R. - Acetylcholinesterase and noradrenaline in the nerves of mammalian dental pulps. Acta Odont. Scand 26: 641-656, 1968.
- ROOZEMOND, R.C. - A comparison of the Baker acid Hematein staining of selected regions of rat hypothalamus with the fatty acids composition of their phosphatidyl choline content and their polar lipid fraction as determined by gas liquid chromatography. Histochem. J. 2: 219-230, 1970.
- SAUERWEIN, E.V. - Neurohistologische Untersuchungen degenerativer Pulpenveränderungen. Dtsch. Zahnärztl. Z. 20: 33-40, 1965.
- SCHMITT, F.O. - Molecular organization of the nerve fiber. "in Biophysical Science - A study Program" edited by J. L. Oncley - John Wiley & Sons - New York - 1959.
- SETTERFIELD, H.E.; SUTTON, T.S. - The use of Polarized Light in the study of Myelin Degeneration. Anat. Rec. 61, 397-411, 1935.
- SIMON, R.G.; WADE, R.R.; DELARCO, J.E.; BAKER, M.L. - Wallerian Degeneration: A sequential process. J. Neurochem. 16: 1435-1438, 1969.

- TAATZ, V.H.; STIEFEL, A. - Untersuchungen zur ultrastruktur menschlicher Pulpanerven. Dentsch. Zahn Mund. Kieferheilk 54, 21-36, 1970.
- THOMAS, P.K.; JONES, D.G. - The cellular response to nerve injury. II. Regeneration of perineurium after nerve section. J. anat. 101: 45-55, 1967.
- TORNECK, C.D.; HARNETT, B.; JOHNSON, T.; LEUNG, T. - The effect of Surgical Denervation on Dentin Formation in the Incisor of the Rat. J. dent. Res. 51: 48-52, 1972.
- UCHIZONO, K.; HOMMA, K. - Electronmicroscopic studies on nerves of human tooth pulp. J. dent. Res. 38: 1133-1141, 1959.
- VACEK, Z.; PLACKOVA, A.; BURES, H. - Electron Microscopy of Innervation of Human Dental Pulp. Folia Morphologica 17: 97-111, 1969.
- VAN HASSEL, H.J. - Physiology of the human dental pulp. in "Biology of the Human Dental Pulp", edited by Siskin, M. Sant Louis - The C. V. Mosby Cy. - 1973.
- VIAL, J.D. - The Early Changes in the axoplasm during Wallerian Degeneration. J. Bioph. and Biochem. Cytol., 4 551-557, 1958.
- WEBSTER, H.F. - Transient, Focal Accumulation of Axonal Mitochondria during the early stages of Wallerian degeneration. J. cell. Biol. 12, 361-377, 1962.

WEBSTER, H.F. - The Relation Between Schmidt-Lantermann incisives and myelin Segmentation during Wallerian Degeneration. - J. anat. 108, 408-420, 1971.

WEDDEL, G.; Gless, P. - The early stages in the degeneration of cutaneous nerve fibre. J. Anat. 76: 65-93, 1941.

WOLMAN, M.; LERNER, S.H. - A Histochemical contribution to the study of the molecular morphology of myelin. J. of Neurochem. 5: 114-120, 1960.