

À memória de meu pai

À minha mãe

À Theresinha, minha espôsa,  
Mário Roberto e Renata Cristina,  
meus filhos

MÁRIO ROBERTO VIZIOLI  
Cirurgião Dentista

"ALTERAÇÕES DENTINÁRIAS EM DENTES HUMANOS CARIADOS"

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade de Campinas, para obtenção do grau de Doutor em Ciências. (Patologia)

Piracicaba  
1968

UNIVERSIDADE DE CAMPINAS  
BIBLIOTECA CENTRAL

Ao Prof. Dr. BENEDICTO DE CAMPOS VIDAL, Livre Docente e Professor da Cadeira de Patologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade de Campinas, Orientador desta Tese, o meu agradecimento profundo e sincero por tudo quanto tem feito, com sua amizade e capacidade, pela minha formação científica.

## AGRADECEMOS

Ao Professor Doutor Zeferino Vaz, Magnífico Reitor da Universidade de Campinas, pela sua inteligência, capacidade e segurança na orientação dos destinos da Universidade de Campinas, da qual fazemos parte;

Ao Professor Doutor Carlos Henrique Robertson Liberali, Diretor da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - da Universidade de Campinas, pelo amparo e estímulo constantes a todos quanto trabalham nesta Casa;

Aos meus colegas da Cadeira de Patologia, Dr. Lourenço Bozzo e Instrutores Luiz Valdrighi e Oswaldo Walder Júnior, pelo auxílio prestado na elaboração desta tese;

Aos senhores Antonio Kerches de Campos e Adilson Pinto Pereira, e à senhorita Linda Sarkis, pela sua colaboração;

A todos quanto, direta ou indiretamente, colaboraram na elaboração deste trabalho.

\*

\* \* \*

## Í N D I C E

1 -	<u>INTRODUÇÃO</u> . . . . .	7
2 -	<u>OBJETIVOS</u> . . . . .	18
3 -	<u>MATERIAL E MÉTODOS</u> . . . . .	19
	3.1 - Fixação. . . . .	19
	3.2 - Descalcificação. . . . .	19
	3.3 - Inclusão em parafina . . . . .	20
	3.4 - Congelamento . . . . .	20
	3.5 - Secções. . . . .	20
	3.6 - Estudos Morfológicos . . . . .	20
	3.6.1 - Dentes descalcificados . . . . .	20
	3.6.2 - Dentes desgastados . . . . .	21
	3.7 - Topoquímica. . . . .	21
	3.7.1 - Métodos para Mucopolissacarídeos ácidos. . . . .	21
	3.7.2 - Métodos para Polissacarídeos neutros . . . . .	22
	3.7.3 - Métodos para Grupos Proteicos. . . . .	22
	3.7.4 - Método para Lipídeos . . . . .	23
	3.8 - Ultraestrutura . . . . .	23
	3.8.1 - Dicroísmo. . . . .	23
	3.8.2 - Birrefringência. . . . .	24
	3.9 - Coloração Bacteriológica . . . . .	24
4 -	<u>RESULTADOS</u> . . . . .	25
	4.1 - Estudos morfológicos . . . . .	25
	4.1.1 - Dentes descalcificados corados pelo Tricrômico de Mallory. . . . .	25
	4.1.2 - Dentes descalcificados e desgastados examinados em contraste de fase . . . . .	26
	4.1.3 - Dentes descalcificados e desgastados examinados em campo escuro. . . . .	30
	4.2 - Topoquímica. . . . .	31
	4.2.1 - Métodos para Mucopolissacarídeos ácidos. . . . .	31
	4.2.2 - Métodos para Polissacarídeos neutros . . . . .	40
	4.2.3 - Métodos para grupos Proteicos. . . . .	40
	4.2.4 - Método para Lipídeos . . . . .	45
	4.3 - Ultraestrutura . . . . .	45
	4.3.1 - Dicroísmo. . . . .	45
	4.3.2 - Birrefringência. . . . .	46
	4.4 - Coloração Bacteriológica . . . . .	50
5 -	<u>DISCUSSÃO</u> . . . . .	52
	5.1 - Estudos Morfológicos . . . . .	52

5.1.1	- Dentes descalcificados corados pelo Tricrômico de Mallory. . . . .	52
5.1.2	- Dentes descalcificados e desgastados examinados em contraste de fase . . . . .	52
5.1.3	- Dentes descalcificados e desgastados examinados em campo escuro. . . . .	55
5.2	- Topoquímica. . . . .	56
5.2.1	- Métodos para Mucopolissacarídeos ácidos. . . . .	56
5.2.2	- Métodos para Polissacarídeos neutros . . . . .	66
5.2.3	- Métodos para Grupos Proteícos. . . . .	68
5.2.4	- Método para Lipídeos . . . . .	72
5.3	- Ultraestrutura . . . . .	74
5.3.1	- Dicroísmo. . . . .	74
5.3.2	- Birrefringência. . . . .	75
5.4	- Coloração Bacteriológica . . . . .	80
5.5	- Dentina Reparativa . . . . .	81
6	- <u>CONCLUSÕES</u> . . . . .	89
7	- <u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u> . . . . .	91
8	- <u>DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA</u> . . . . .	98

\*

\* \*

## 1 - INTRODUÇÃO

A cárie dental adquire um aspecto próprio quando, vencendo a barreira do esmalte, atinge a dentina. Neste tecido, ocorrem alterações que vêm sendo objeto de estudos há muitos anos, antes mesmo do começo do século.

Assim, FISH (1930) conceitou o "tracto morto" da dentina como sendo uma zona injuriada entre a área da lesão periférica e a polpa, havendo, frente a esta última, o selamento por "dentina secundária".

BEUST (1933 a) realizou observações sobre as consequências, na dentina, do processo de cárie. Afirmou que a área cariada, na dentina de um dente vivo, é circundada por dois "cilindros" (cylinders) de tecido modificado, o interno compondo a "zona impenetrável transparente", e o externo consistindo em uma área "inflamatória" (?). Tal conceito, como é evidente, causou estranheza, desde que o conceito de inflamação jamais havia sido aplicado à dentina. Procurando justificar a denominação por êle utilizada, - BEUST (1933 b), em outro trabalho, disse que o conceito "inflamatório" presumia uma condição de defesa ativa do tecido, reagindo à irritação, sendo que, segundo as suas concepções, tal conceito não compreendia as áreas relativamente inertes, cromóforas e esclerosadas, mas sim uma área mais ativa, cujos canalículos estavam abertos à difusão do plasma da circulação pulpar. Esta área seria uma transição entre a dentina normal e as formas de esclerose.

Continuando seus trabalhos sobre dentina cariada, BEUST (1936) afirmou que foi possível demonstrar a dentina completamente esclerosada, impermeável e cromófoba (a qual era mais dura e mais ácido-resistente que a dentina normal), na região subjacente à area cariada.

Como se nota, não havia ainda, por parte dos pesquisadores, a preocupação em penetrar a fundo na questão concernente ao mecanismo de destruição da cárie, relacionando-o com as modificações das estruturas que compõem a dentina. Tal preocupação começou a transparecer em uma série de pesquisas realizadas com o fito de se confirmar o papel das bactérias na produção das alterações da dentina. BURNETT e SCHERP (1953) realizaram observações -

sobre o efeito das bactérias acidogênicas e proteolíticas na dentina, deduzindo que as bactérias acidogênicas descalcificam a dentina intacta e produzem alterações em sua matriz, tornando-a acessível aos enzimas; tais bactérias, entretanto, não são capazes de lisar o componente orgânico da dentina. Por outro lado, as bactérias proteolíticas da cárie dental, segundo esses autores, são capazes de produzir somente pequenas alterações na dentina intacta, mas digerem literalmente a proteína dentinária.

PROPHET (1954), investigando a ação bacteriana na dentina, afirmou que a invasão inicial das bactérias tem por caminho o prolongamento odontoblástico, sendo que poucas bactérias são capazes de destruir a matriz orgânica da dentina; tais bactérias são ativas somente após a descalcificação da matriz. Prosseguindo, PROPHET afirmou que nas partes mais profundas da lesão cariada, somente a matriz imediatamente circundante aos canalículos mostra alteração, mas nas partes superficiais, toda a área intercanalicular é afetada. Terminando, concluiu que a dentina cariada contém colágeno, como a dentina normal, e a sua completa destruição é um estágio final da cárie dental.

KRONFELD (1955 a), estudando dentes desgastados e descalcificados, portadores de cárie de dentina, afirmou o seguinte: "... o primeiro estágio da cárie de dentina é a invasão canalicular pelas bactérias, seguida de descalcificação da matriz, em virtude de tais elementos". Resumindo as alterações que ocorrem na dentina cariada, este autor dividiu-as em cinco zonas:

1 - zona de dentina completamente descalcificada, com destruição das paredes dos canalículos e decomposição da matriz - descalcificada; 2 - zona de descalcificação incipiente, resultante da ação das bactérias invasoras; 3 - zona de obliteração dos canalículos, por calcificação reacional das fibras de Tomes (zona de transparência); 4 - zona de degeneração gordurosa e início de precipitação de sais de cálcio no citoplasma das fibras de Tomes; e 5 - zona de dentina normal, com os canalículos dentinários, aparentemente, não perturbados.

BRADFORD (1957), realizando colorações de Gram em dentes descalcificados por meio de agentes quelantes, concluiu que o material interno dos canalículos afetados era granular e Gram-positivo, não sendo bactérias, pois tal material possuía granulações muito menores que as bactérias e corava-se gradativamente pelo Gram.

Prosseguindo em suas pesquisas, BRADFORD (1958 a) afirmou que a aproximação da cárie em direção à dentina, parece produzir dois efeitos opostos no tecido: ou os canalículos tornam-se ocluídos, ou então não há reação aparente. Em seguida, disse que estes dois efeitos podem ser notados na mesma área de um dente, ou mesmo em canalículos adjacentes. Os canalículos ocluídos, segundo suas observações, são resistentes ao ataque bacteriano depois da descalcificação pela cárie, enquanto os canalículos não ocluídos tornam-se aumentados às expensas da matriz pericanalicular, formando o caminho para a invasão bacteriana.

Em se tratando de um assunto que abrange setores diversificados, as pesquisas sobre a cárie de dentina dividiram-se em vários campos de investigação. Um desses campos se relaciona com a ação dos enzimas sobre o tecido. ARMSTRONG (1959), investigando a resistência da dentina cariada à colagenase, afirmou que tal resistência é devida à modificação da matriz orgânica e dos grupos epsilon-amino, guanidílicos e carboxílicos. Em seguida, faz referência a um decréscimo na capacidade de fixação de corantes ácidos e a um aumento na capacidade de fixação de corantes básicos, na dentina cariada.

BRADFORD (1960) refere-se ao fato que, no processo de cárie de dentina, ocorre uma despolimerização do tecido. É de fundamental importância a sua afirmação: "... de maneira surpreendente, a despolimerização da dentina pericanalicular não a torna mais sensível ao ataque bacteriano, aumentando mesmo a sua resistência, de maneira que é possível ver, no fundo de cavidades cariadas, colunas de dentina pericanalicular livres, enquanto a dentina intercanalicular foi toda destruída. Logo, um canalículo que foi completamente bloqueado constituir-se-á numa excelente barreira à penetração de bactérias, não só devido ao seu alto grau de calcificação, mas também devido à natureza de sua matriz".

STONES (1962 a), fazendo referência ao mecanismo e evolução da cárie de dentina, afirmou que a dentina geralmente sofre esclerose antes mesmo de ser invadida pelas bactérias.

Abordando a cárie dentinária sob o aspecto de suas características físicas e químicas, YOUNG e MASSLER (1963) imergiram dentes normais e cariados em três ácidos minerais (níttrico, clorídrico e sulfúrico) e três soluções de enzimas proteolíticos (colagenase, pepsina e tripsina). Concluíram que a dentina cariada foi mais resistente ao ácido e à decomposição proteolítica que

a dentina normal.

Ainda sobre as propriedades da dentina cariada, ARMSTRONG (1964 a) disse o seguinte: "... a comparação das propriedades da dentina cariada com aquelas dos componentes carboidratados da dentina normal, artificialmente preparados, evidenciam que a reação da matriz dentinária com carboidratos e/ou derivados, provavelmente ocorre durante o processo de cárie".

Em outro trabalho, ARMSTRONG (1964 b) asseverou que a redução ou desintegração da matéria orgânica ocorre, de preferência, em cáries incipientes, e que a remoção do material inorgânico é um pré-requisito necessário a algumas colagenases para atacar a matriz orgânica. Afirmou também que 20% a 30% da matriz orgânica cariada é completamente resistente à colagenase.

Em 1966, FUSAYAMA e col., estudando as alterações dentinárias decorrentes da cárie, por métodos bacteriológicos, concluíram que, na dentina cariada, a invasão microbiana era sempre precedida por amolecimento e descoloração da dentina, argumentando que, provavelmente, tais fenômenos poderiam ser derivados da ação de produtos bacterianos, à distância.

No processo de cárie, entram em jogo inúmeras transformações químicas das estruturas que compõem o tecido dentinário. Por esse motivo, os pesquisadores recorreram à histoquímica. Neste particular, destaca-se o trabalho realizado por SOGNAES e WISLOCKI (1950). Estes autores realizaram diversas reações histoquímicas com o propósito de demonstrar a presença de mucopolissacarídeos ácidos, lipídios, glicogênio e outras substâncias nos tecidos cariados. No que se refere à dentina cariada, concluíram que "... existe uma alteração nos mucopolissacarídeos ácidos, resultando em uma diminuição das reações metacromáticas e basofilia normalmente presentes nas paredes dos canalículos dentinários. Exceto a despolimerização dos MPA, os canalículos parecem normais em tamanho, ou apenas levemente aumentados, não contendo nenhum microorganismo demonstrável por meio de colorações bacteriológicas de rotina". Estas observações foram válidas para a fase inicial do processo carioso. Prosseguindo, os autores observaram que "... estágios mais avançados da lesão foram caracterizados por extensa invasão de microorganismos. Nesta altura, muitos dos canalículos tornaram-se distendidos às expensas da matriz circundante, e ocluíram-se com microorganismos predominantemente esféricos e Gram-positivos. O material obliterante dos canalículos foi fortemente sudanófilo e PAS-positivo".

Em um trabalho específico sobre a dentina cariada, ENGEL (1950) estudou o amolecimento da dentina, afirmando que durante o processo de cárie, estabelecem-se duas atividades despolimerizantes, que parecem ser devidas à hialuronidase e à colagenase, originadas de atividades bacterianas. Segundo este autor, a cárie de dentina é caracterizada por despolimerização do complexo proteína-carboidrato da dentina.

MARTENS e col. (1959) afirmaram que, como resultado da cárie, os agregados proteína-carboidratos da dentina são "rompidos ou despolimerizados", e grupos mais reativos tornam-se disponíveis, produzindo um aumento na coloração pelo PAS. A reação PAS-positiva, segundo estes autores, está relacionada com o grau de polimerização do tecido de uma maneira direta, e prosseguem dizendo que a metacromasia com Azul de Metileno ou Azul de Toluidina desaparece, indicando que os mucopolissacarídeos ácidos foram despolimerizados.

Em 1960, OPDYKE, trabalhando com esmalte e dentina cariados, relatou que as lesões cariosas foram, histoquimicamente, os locais mais reativos do dente.

JOLLY e SULLIVAN (1960) mostraram, por meio de reações histoquímicas em dentes não descalcificados, que a extensão da desmineralização é sempre maior do que a área de alteração estrutural da dentina. Demonstrando a presença de enzimas proteolíticos, eles concluíram que a área na qual os enzimas estão presentes é semelhante, em forma, à zona de desmineralização, mas é sempre menor em dimensões. Em seguida, chamaram a atenção para o fato de que o número de partículas intracanaliculares reconhecidas como microorganismos não é grande o suficiente para que se possa encará-lo como fator primordial na produção da lesão.

VIDAL (1961), trabalhando com o fito de esclarecer a identidade dos agentes que causam modificações da matriz orgânica da dentina e a natureza das substâncias implicadas na obliteração dos canalículos, constatou que:

" 1) Há presença de granulações intracanaliculares, - cujas reações histoquímicas nos levam a crer serem complexos de carboidratos, proteínas e mucopolissacarídeos ácidos;

2) deve haver passagem de substâncias dos canalículos - para a substância fundamental da dentina, pois observamos, em alguns casos, zonas metacromáticas que se difundiam dos canalículos, o que falaria a favor da difusão de mucopolissacarídeos ácidos".

O autor adverte, porém, que tais afirmações necessitam maior número de observações que as confirmem.

MACHA e col. (1966) realizaram um estudo com a finalidade de pesquisar as alterações histoquímicas dos mucopolissacarídeos, que se processam nas áreas de dentina próximas à cárie, não comprometidas pela presença de bactérias. Utilizaram métodos histoquímicos e microscopia de polarização. Suas conclusões foram as seguintes:

" 1) Durante a evolução do processo carioso, manifesta-se uma despolimerização de mucopolissacarídeos ácidos à distância das bactérias;

2) na zona pericanalicular da dentina esclerosada existem modificações do colágeno, chegando o mesmo a desaparecer (essa conclusão foi baseada no desaparecimento da "cruz de polarização" e perda de birrefringência da zona);

3) A zona intercanalicular parece ser a mais preservada, sendo a última a desorganizar-se durante a evolução da cárie crônica."

TOTO (1966), estudando o amolecimento da dentina cariada, usou métodos histoquímicos para a detecção de mucopolissacarídeos ácidos e grupos sulfidríla. Afirmou que nem os processos odontoblásticos nem o colágeno da dentina cariada reagiram aos testes para MPA, e que existe uma perda de grupos sulfidríla na zona superficial da lesão de cárie; êsses grupos, entretanto, ainda subsistem na zona mais profunda da cárie, próxima à dentina normal. Concluiu também que as bactérias (micrococos) parecem estar relacionadas a uma perda de MPA na dentina cariada, sugerindo que o amolecimento da dentina é causado por uma perda de mineral ligada a uma perda de mucopolissacarídeos ácidos.

As pesquisas histoquímicas também foram orientadas no sentido de se detectar a presença de lipídeos na dentina cariada. DIRKSEN (1963), trabalhando nesse sentido, observou que a dentina cariada contém vários fosfatídeos em diversos graus de degradação.

MILLER (1963) afirmou que os corantes para gordura, por êle empregados na dentina cariada, localizaram-se de preferência nas camadas mais superficiais da lesão, e relacionou essa gordura com a presença de bactérias naquelas regiões.

ALLRED (1966 a), fazendo observações na dentina cariada, assinalou a presença de lipídeos na dentina intercanalicular e na dentina pericanalicular. Sugeriu, que muitos dos componentes lipí

dicos da cárie são de origem intrínseca, não excluindo, entretanto, a possibilidade de componentes extrínsecos.

A microscopia de fluorescência foi pouco aplicada nas pesquisas sobre cárie de dentina. Em 1929, BENEDICT realizou um estudo de fluorescência natural de dentina normal e cariada. Concluiu que a dentina cariada não possui fluorescência, enquanto que a dentina normal descalcificada retém essa propriedade. Afirmou que a matéria orgânica é o componente fluorescente da dentina.

ARMSTRONG (1963 a) investigou a fluorescência natural da dentina humana, normal e cariada, chegando à conclusão que existem na dentina cariada a presença de "cromóforos", os quais agem como se fôsem "filtros internos", exercendo assim um aparente efeito de redução das propriedades fluorescentes da dentina cariada, concorrendo para a perda de fluorescência natural observada nas lesões de cárie. Ainda em 1963 (b), completando o trabalho anterior, ARMSTRONG afirmou que dentinas cariadas individuais absorvem quantidades diferentes de emissão ultravioleta, havendo uma relação entre a quantidade de redução de fluorescência e a quantidade de material UV cromóforo presente.

Outro método empregado pelos pesquisadores nos estudos sobre a cárie de dentina e seus efeitos no tecido foi a microscopia de polarização. CAPE e KITCHIN (1930) estudaram, por este método, dentes normais e cariados e informaram que "... a dentina irritada tem uma luminosidade peculiar (luminosidade de birrefringência), a qual se pode atribuir a dois fatores:

a) remoção da substância inorgânica de uma área particular;

b) aumento considerável na birrefringência da substância orgânica.

É possível que este aumento de luminosidade funcione como parte do mecanismo de defesa contra a cárie".

KEIL (1955), estudando sob luz polarizada a dentina cariada, relatou que nos canalículos da dentina alterada pela cárie, existiam cristais arredondados e longos, birrefringentes.

GRADY e YAEGER (1965) estudaram, sob luz polarizada, a dentina anormal produzida por injeções de estrôncio e fluoretos, e concluíram que enquanto na dentina normal as fibras de colágeno são orientadas perpendicularmente aos canalículos dentinários, na dentina hipomineralizada as fibras de colágeno são dispostas a 45° em relação às fibras da dentina normal. Esta diferença de o-

orientação parece indicar alterações do colágeno ao nível das regiões de calcificação pela apatita. Pode-se tratar, também, de uma alteração da substância fundamental que cerca as fibras em desenvolvimento.

A microscopia eletrônica forneceu preciosos subsídios à pesquisa das alterações ultraestruturais que ocorrem na dentina cariada. Em 1954, SCOTT e ALBRIGHT fizeram pesquisas sobre bactérias em dentes cariados artificialmente descalcificados, e dentes cariados não desmineralizados. No primeiro caso, afirmam eles que microorganismos são notados em tôdas as regiões da dentina cariada; em menor número, encontram-se na zona mais profunda da cárie. Na dentina não desmineralizada, a localização das bactérias foi semelhante.

BERNICK e col. (1954) demonstraram, por meio de fotomicrografias eletrônicas, as diferentes zonas de reação à cárie, baseados no grau de invasão bacteriana. Concluíram que a zona mais superficial da cárie é caracterizada por completa descalcificação e decomposição da dentina. A segunda zona é uma área de descalcificação incipiente, na qual as bactérias invadiram os canalículos. Os canalículos esclerosados encontram-se obliterados por um material homogêneo calcificado. Nas camadas mais profundas, poucos canalículos contém microorganismos.

TAKUMA e KURAHASHI (1962), estudando por meio de microscopia eletrônica a dentina cariada, concluíram que existe mineralização, secundária na área de invasão bacteriana, bem como no processo odontoblástico da zona esclerosada. Afirmaram ainda que a destruição da matriz dentinária parece começar na zona pericanalicular.

JOHANSEN (1962), pesquisando a natureza da cárie dental disse que muito frequentemente, a zona pericanalicular exibe uma camada hipermineralizada, em contraposição à matriz intercanalicular, extensamente desmineralizada, sendo que tal desmineralização precede a proteólise.

Em 1964, FRANK e col. demonstraram que a cárie de dentina é acompanhada de fenômenos de cristalização inorgânica na luz dos canalículos, caracterizada pela deposição progressiva de cristais de apatita sobre um substrato orgânico, formado pelos restos do prolongamento de Tomes, promovendo a impermeabilização desses canalículos. Afirmou também que as bactérias invadem os canalículos depois da destruição da luz esclerosada e da zona perica-

nalicular.

BANEZ e JOHANSEN (1964) fizeram referência ao fato que, na zona cariada profunda da dentina, os canalículos, envolvidos por zonas pericanaliculares hipermineralizadas, contém apenas grandes cristais espalhados e microorganismos; na zona esclerosada, os canalículos são totalmente obliterados.

SARNAT e MASSLER (1965), fazendo um estudo eletrônico sobre as diversas zonas da dentina cariada, assim concluíram:

"a) a zona infectada, rica em bactérias, dispõe-se dentro da porção profunda da camada necrótica e na porção superior da camada descalcificada;

b) a porção mais profunda da camada descalcificada está livre de bactérias e contém grandes cristais, presumivelmente formados por reprecipitação de apatita dissolvida pelos ácidos bacterianos;

c) a esclerose inicia-se cedo, na junção entre a camada descalcificada e a dentina normal;

d) as camadas profundas da dentina estão livres de bactérias".

HABERMAN e col. (1967) estudaram por meio de microscopia eletrônica a dentina cariada, e concluíram que a dentina pericanalicular persiste densamente mineralizada, mesmo nas zonas cariadas; em seguida, afirmaram que a zona profunda da dentina hipermineralizada parece representar uma resposta protetora por parte do tecido.

Finalmente, torna-se necessário abordar um ponto que está intimamente relacionado com a cárie dental, especialmente com a cárie de dentina. É sabido que a polpa reage aos estímulos da cárie, promovendo a formação de um tecido dentinário diferente da dentina normal. O termo naturalmente usado para designar tal tecido é "dentina secundária". No entanto, inúmeras designações têm sido propostas, baseadas em diversos fatores inerentes a este tipo de tecido dentinário.

Assim é que BEVELANDER e BENZER (1943) a chamaram de "dentina adventícia". Estudando a sua incidência e morfologia, concluíram que dentes cariados, invariavelmente, mostram dentina esclerosada adjacente e abaixo da zona cariada, bem como podem apresentar "dentina secundária adventícia", sendo que a estrutura desta dentina é semelhante àquela observada na área circumpulpar. Relataram ainda que parece haver uma relação direta entre a incidên

cia de "dentina secundária adventícia" e a profundidade da cárie da dentina.

GOTTLIEB (1946) relatou que a deposição de dentina no canal pulpar parece depender do grau pelo qual a camada de odontoblastos é capaz de formar a dentina. Se os odontoblastos são danificados numa área limitada, resulta aumento localizado de "dentina secundária".

BENZER (1948) faz distinção entre a dentina dependente de estímulos patológicos e a por êle denominada "dentina secundária fisiológica". Segundo êste autor, esta última não depende de estímulos de qualquer natureza para sua formação.

KRONFELD (1955) disse que as perturbações graves do metabolismo podem atingir os odontoblastos a tal ponto que os canaliculos da dentina sofrem uma mudança brusca de direção e um número maior ou menor de odontoblastos podem deixar de formar canaliculos. Esta dentina é por êle chamada "dentina secundária".

SELTZER (1959), estudando os problemas concernentes à dentinogênese "reparativa", elaborou as seguintes etapas na formação do tecido: a) injúria dos odontoblastos; b) resposta inflamatória; c) diferenciação de novos odontoblastos de células formadoras de matriz; d) síntese de precursor~~es~~ de colágeno (grânulos citoplasmáticos); e) secreção de precursor~~es~~ de colágeno (aminopolissacarídeos não sulfatados associados com proteínas); f) sulfatação dos aminopolissacarídeos complexados com proteínas; g) formação de fibrilas colágenas (matriz) e h) atração de sais minerais. Como se nota, êste autor emprega a designação "dentina reparativa".

Em 1959, KUTTLER disse que a dentina formada por estímulos irritantes severos como a cárie de dentina, deveria ser chamada "dentina terciária", distinta da dentina secundária que se acumula circumpulparmente, devida a estímulos funcionais.

CAVANHA (1959-60 a) estudou a "dentina secundária" em microscopia de polarização, usando diferentes meios de embebição. Constatou que qualquer que seja o meio de embebição, existem na dentina secundária cinco zonas distintas, e que a chamada linha escura, observada em luz transmitida, traduz-se por uma zona onde há grande concentração de cristais de apatita, em relação à substância orgânica. Essa região exhibe birrefringência negativa, contrariamente às demais zonas da dentina secundária.

O mesmo CAVANHA (1959-60 b), em outro trabalho com luz

polarizada, concluiu que enquanto nas faces laterais da cavidade pulpar encontrava-se sempre a presença de birrefringência negativa, em três observações feitas na porção incisal, somente em um caso essa birrefringência foi constatada. Ainda afirmou que, sob luz polarizada, difere bastante o aspecto da "dentina secundária" encontrada nas paredes laterais da cavidade pulpar, quando confrontado com o aspecto na porção incisal da cavidade pulpar.

STONES (1962 b) afirmou que a "dentina secundária" é uma deposição de dentina adicional ou outro material mineralizado na extremidade pulpar dos canalículos. Quando devida a uma lesão localizada, a dentina é depositada somente junto aos canalículos que foram afetados.

CORBETT (1963) concluiu que a incidência de "dentina secundária" abaixo de lesões cariosas é alta, tanto em dentes permanentes como em dentes decíduos, e que a presença de dentina secundária não evita que irritantes passem à polpa e causem inflamação.

Em 1966, STANLEY e col. afirmaram que a espessura da dentina primária, por si só, não parece ter efeito na produção de "dentina reparativa ou terciária". Entretanto, técnicas operatórias induzindo traumas consideráveis aumentaram a produção de dentina reparativa.

SASSO e col. (1966) estudaram a "dentina reparativa" - por meio de técnicas histoquímicas e luz polarizada. Concluíram - que a dentina reparativa é rica em colágeno, cujas fibras se dispõem em várias direções, e que possui poucos canalículos, bastante irregulares. Afirmaram ainda que esse tipo de dentina possui mucopolissacarídeos ácidos associados a glicoproteínas, e que a hipocalcificação desta estrutura é devida a um paralelismo existente entre o nível condroitinsulfato B e o grau de calcificação.

\*

\* \*

## 2 - OBJETIVOS

Os trabalhos citados na introdução desta pesquisa permitem uma visão geral do que até hoje se realizou a respeito da cárie de dentina, bem como do seu mecanismo e consequências. Entretanto, muitas questões, levantadas ainda se encontram sem explicações satisfatórias, ou têm explicações controvertidas.

No presente trabalho, propõe-se o estudo de alguns pontos, ainda discutíveis, e de outros, não abordados de uma maneira objetiva, e que são:

- a) Sinais de dissociação entre mucopolissacarídeos ácidos e colágeno, na cárie de dentina.
- b) o estado de agregação das macromoléculas de mucopolissacarídeos ácidos na zona cariada da dentina.
- c) o estado de agregação macromolecular do colágeno, na região de cárie de dentina.
- d) a natureza do material acumulado no interior dos canalículos.
- e) aspectos histoquímicos e histofísicos da dentina reparativa diante do processo de cárie.

\*

\* \*

### 3 - MATERIAL E MÉTODOS

Foram selecionados para a presente pesquisa dentes cariados de pessoas adultas, entre 20 e 30 anos de idade. Não foram utilizados dentes cuja cárie se apresentava demasiado superficial, nem aqueles extensamente destruídos, pois a finalidade era estudar tôdas as zonas de cárie de dentina, o que não seria possível nos estágios de cárie excluídos. Nestas condições, foram reunidos 40 dentes recém-extraídos, para serem descalcificados, e 20 dentes que foram desgastados, para estudos de material não descalcificado. Dentes normais foram utilizados para estudos comparativos.

#### 3.1 - FIXAÇÃO

Os dentes, imediatamente após a extração, foram lavados em sôro fisiológico e fragmentados para a retirada das partes a serem estudadas. Em seguida, os fragmentos foram colocados em formol a 10%, durante 24 horas, à temperatura ambiente ( $\pm 23^{\circ}\text{C}$ ). - Outra parte do material foi fixada em solução de Newcomer, segundo SAUNDERS (1964), durante 24 horas, para pesquisa de mucopolissacarídeos ácidos. Uma terceira parte do material foi fixada em formol-cálcio, também durante 24 horas, para detecção de lipídeos.

#### 3.2 - DESCALCIFICAÇÃO

A descalcificação através de soluções ácidas pode produzir alterações na coloração geral do tecido e na sua estrutura, - conforme pesquisas de BRAIN e EASTOE (1962). O mesmo ocorre com o processo de descalcificação eletrolítico. Tendo em vista produzir o mínimo de alterações na dentina, elegeu-se o método de descalcificação por meio de um agente quelante, o EDTA (etilenodiamina tetra-acetato di-sódio). As peças foram colocadas, após a fixação, - em uma solução de EDTA a 5% em água destilada, tamponada através do NaOH em pH 7. Os fragmentos colocados na solução assim preparada foram levados à estufa a  $37^{\circ}\text{C}$ . A descalcificação levou em média 9 dias, trocando-se a solução a cada 3 dias.

Após a descalcificação, os fragmentos foram divididos - em 2 lotes: o primeiro lote compôs-se de fragmentos a serem incluídos em parafina, enquanto que o segundo lote foi congelado.

### 3.3 - INCLUSÃO EM PARAFINA

A inclusão em parafina foi realizada segundo a técnica rotineira.

### 3.4 - CONGELAÇÃO

O segundo lote de peças foi levado ao aparelho "CRYO CUT A.O." e congelado a  $-25^{\circ}\text{C}$ .

### 3.5 - SECÇÕES

Os fragmentos incluídos em parafina foram cortados no micrótomo "JUNG AG", na espessura de 5 microns. Os fragmentos congelados foram cortados no aparelho "CRYO CUT A.O.", na espessura de 10 microns.

### 3.6 - ESTUDOS MORFOLÓGICOS

#### 3.6.1 - Dentes descalcificados

a) Secções de dentes descalcificados, incluídos em parafina, foram corados pelo Tricrômico de Mallory, e examinados em luz transmitida comum através de um microscópio "E.LEITZ ORTHOLUX".

b) Secções de dentes descalcificados, cortados por congelamento e não corados, foram examinadas em contraste de fase e campo escuro, no microscópio "E.LEITZ ORTHOLUX", nos seguintes meios de embebição:

- 1) água destilada.....(índice de refração  $n = 1,3328$ )
- 2) propilenoglicol....(índice de refração  $n = 1,4307$ )
- 3) glicerina pura.....(índice de refração  $n = 1,4550$ )
- 4) vaselina líquida...(índice de refração  $n = 1,4615$ )
- 5) óleo de amêndoa....(índice de refração  $n = 1,4679$ )
- 6) óleo de cedro.....(índice de refração  $n = 1,5050$ )
- 7) alfa-bromonaftol...(índice de refração  $n = 1,6541$ )

Os índices de refração destes meios de embebição foram determinados pelo refratômetro segundo ABBE, "ZEISS JENA".

### 3.6.2 - Dentes desgastados

Os estudos morfológicos em dentes desgastados foram feitos através do microscópio "E. LEITZ ORTHOLUX", em contraste de fase e campo escuro, nos mesmos meios de embebição usados para cortes descalcificados.

### 3.7 - TOPOQUÍMICA

Os métodos topoquímicos foram divididos nos seguintes itens:

#### 3.7.1 - Métodos para mucopolissacarídeos ácidos

##### a) Basofilia Metacromática com Azul de Toluidina

Devido à controvérsia existente entre os autores quanto ao papel do álcool na intensidade e natureza da coloração metacromática, foram realizados dois tipos de exame: o primeiro tipo - constou de cortes descalcificados corados em soluções de Azul de Toluidina a 0,025%, tamponadas a pH 5, 4, 3,5, 3, 2,5 e 1,7, pelo tampão de Mc Ilvaine, durante 30 minutos. Após a coloração, os cortes foram desidratados pelo álcool, diafanizados e montados em bálsamo do Canadá, segundo a técnica recomendada por Mc CLUNG'S - HANDBOOK OF MICROSCOPICAL TECHNIQUE (1961). O segundo tipo de exame consistiu em corar os cortes da mesma maneira descrita acima, nas mesmas condições de pH. Após a coloração, cada corte foi embebido numa gota da sua própria solução corante, sobre a qual se montou a lamínula. Procedeu-se em seguida ao exame microscópico imediato, eliminando os possíveis inconvenientes da desidratação alcoólica.

A determinação do pH das soluções corantes foi feita através do potenciômetro "METROHM E. 350".

##### b) Método do Azul de Alcian pH 2,5 para mucopolissacarídeos ácidos, segundo LISON (1954).

##### c) Método do Azul de Alcian pH 1 para mucopolissacarídeos ácidos sulfatados, segundo LEV e SPICER (1964).

##### d) Fluorescência

Utilizou-se o método da Corifosfina, segundo VIZIOLI e VIDAL (1966). As soluções de Corifosfina a 1/10.000 foram tamponadas pelo tampão de Mc Ilvaine nos mesmos pH usados para a basofilia metacromática. O equipamento usado para as observações em

fluorescência foi o fotomicroscópio "ZEISS POL", com filtro de excitação BG 13/4 e filtro de barreira 53.

e) Tratamento pela Hialuronidase Testicular

Este tratamento foi feito segundo as indicações de LISON (1960 a); após a digestão enzimica, os cortes foram corados com Azul de Toluidina, nas mesmas condições de concentração e pH já mencionados.

f) Reações de bloqueio

As reações de bloqueio efetuadas foram a metilação, segundo FISHER e LILLIE (1954), e a metilação seguida de saponificação, conforme indicado por SPICER e LILLIE (1959). Após ambas as reações de bloqueio, os cortes foram tratados pelo Azul de Toluidina, nas mesmas condições já descritas.

### 3.7.2 - Métodos para Polissacarídeos Neutros

a) Método do Ácido periódico-Schiff (PAS), segundo LISON (1960 b).

b) Digestão do Glicogênio pela Amilase salivar, segundo recomendado por LISON (1960 c).

Após a digestão, os cortes foram tratados pelo Ácido periódico-Schiff, acompanhados pelos cortes-testemunha.

### 3.7.3 - Métodos para grupos Protéicos

a) Acidofilia total pelo método do Orange G

Este método foi modificado da técnica original de DEITCH (1955). Este autor usava uma solução de amarelo de naftol S a 1%, pH 2,78. Utilizou-se neste trabalho uma solução de Orange G a 0,5%, pH 1,7. Solução-tampão é constituída de acetato de sódio 0,1 M e ácido clorídrico normal). A concentração original foi diminuída para evitar a formação de precipitação, e o pH foi abaixado para se conseguir uma reação mais específica para os grupos básicos das proteínas. O desenvolvimento da técnica é o seguinte:

1) Cortes desparafinados e hidratados foram tratados durante 10 minutos por uma solução aquosa de Orange G a 0,5%, pH 1,7.

2) Após a coloração, os cortes foram diferenciados na própria solução-tampão pH 1,7, durante 15 a 24 horas.

3) Lavagem rápida em álcool n-butílico.

4) Diafanização em xilol e montagem em bálsamo do Canadá.

b) Determinação do ponto isoelétrico aparente

Este método foi realizado segundo a técnica original de PISCHINGER (1926), determinando-se o P.I.A. da dentina cariada e da dentina normal, da seguinte maneira: combinou-se o microscópio "E. LEITZ ORTHOLUX" com o fotômetro "REMIPHOT D 959 REICHERT". A intensidade de luz foi regulada no amperímetro para 4,5. Adaptou-se no trajeto luminoso um dispositivo (disco de cartão preto) com um orifício central, para possibilitar a obtenção de um foco de luz puntiforme. Este foco de luz, passando através de uma régua monocromadora "ZEISS", adaptada ao microscópio "ORTHOLUX", foi transformado em luz monocromática, incidindo sobre o corte. Os exames foram feitos com a objetiva acromática de 45 aumentos e oculares de 12 aumentos. No fotômetro "REMIPHOT" adaptou-se uma escala linear de 0 a 100, dividida de 5 em 5 unidades, sendo o ponto 100 o máximo de absorção de luz, e o ponto 0 a quantidade de luz que passou por um corte branco (sem coloração). Os resultados obtidos através da escala linear foram transformados em valores logarítmicos, uma vez que o funcionamento do "REMIPHOT" é condicionado à escala logarítmica. Após a conversão, os resultados foram convertidos em gráfico.

c) Reação da Ninhidrina-Schiff para grupo amino

Esta reação foi efetuada segundo as indicações de YASUMA e ICHIKAWA (1953).

d) Reação de Sakaguchi para grupo guanidil

Este método foi realizado segundo a técnica preconizada por BAKER (1947).

e) Desaminação

A desaminação foi realizada segundo PEARSE (1960).

#### 3.7.4 - Método para Lipídeos

Utilizou-se, para a detecção de lipídeos, a técnica do Sudan Black, segundo LISON (1960 d).

### 3.8 - ULTRAESTRUTURA

#### 3.8.1 - Dicroísmo

Os estudos de dicroísmo foram feitos segundo as indicações de VIDAL (1963). Após a coloração com solução aquosa de Azul de Toluidina a 0,05%, pH 4, os cortes foram examinados sob luz

polarizada, com o analisador colocado fora do trajeto ótico do -  
microscópio, permanecendo em seu lugar somente o polarizador. Uti-  
lizou-se para os exames microscópicos o fotomicroscópio "ZEISS -  
POL".

### 3.8.2 - Birrefringência

Os exames de birrefringência foram feitos em cortes des-  
gastados e descalcificados, sem coloração. Os cortes descalcifica-  
dos foram examinados antes e após a desparafinação. Os dentes fo-  
ram montados em três meios de embebição: água destilada (n=1,3328),  
óleo mineral puro ("Nujol", n = 1,4799) e alfa-bromonaftol -  
(n = 1,6541). A sequência dos exames foi a seguinte:

1) exame dos cortes descalcificados e desgastados entre  
o polarizador e o analisador, sem compensador.

2) exame dos mesmos dentes entre o polarizador e o ana-  
lisador, com compensador de gesso vermelho de primeira ordem.

Utilizou-se, para os exames, o fotomicroscópio "ZEISS -  
POL".

### 3.9 - COLORAÇÃO BACTERIOLÓGICA

As pesquisas para a localização das bactérias na denti-  
na cariada foram efetuadas submetendo-se cortes descalcificados à  
coloração de Gram para tecidos, segundo LILLIE (1954).

\*

\* \*

#### 4 - RESULTADOS

Os resultados serão expostos de um modo tanto quanto possível condensado, dado o volume considerável das observações levadas a efeito através das diversas técnicas. Quando os resultados assim o permitirem, será feita uma apresentação por meio de quadros.

Visando a simplicidade de expressão, e para evitar repetições, atribuiu-se a cada uma das zonas estudadas um número, da seguinte maneira:

ZONA 1 - Zona superficial de desorganização total. É interessante ressaltar que em diversas técnicas, a zona 1 apresentou reações diferentes entre a região externa e a região interna em contacto com os canalículos subjacentes.

ZONA 2 - Zona de alteração estrutural dos canalículos e da matriz dentinária. Devido à diversidade dos resultados apresentados pela zona 2, ela foi dividida em duas regiões, denominadas "região superficial" e "região profunda", de acordo com as suas relações topográficas.

ZONA 3 - Zona de dentina esclerosada.

ZONA 4 - Dentina reparativa.

#### 4.1 - ESTUDOS MORFOLÓGICOS

##### 4.1.1 - Dentes descalcificados corados pelo Tricrômico de Mallory.

Dentina normal - a dentina normal apresentou a matriz intercanalicular corada fortemente em alaranjado. A dentina pericanalicular corou-se fortemente em vermelho violáceo. Não foram notadas as ramificações laterais dos canalículos. O interior dos canalículos, mostrou um delgado filamento corado em violeta.

Dentina cariada:

Zona 1 - a zona 1 mostrou-se constituída por uma estrutura fibrosa totalmente desorganizada, contendo restos fibrosos azul-avermelhados, entremeados com uma substância granular corada em vermelho. As áreas mais internas desta zona mostraram restos de canalículos, assim como a dentina intercanalicular, corada em azul, totalmente desintegrada.

Zona 2 - a região superficial da zona 2 apresentou canalículos com diâmetro aumentado, até cerca de 3 vezes o diâmetro -

original. Alguns estavam completamente destruídos, formando pequenas cavidades, que unindo-se a outras semelhantes, formavam cavidades maiores, cheias de material granular, corado em vermelho. O interior dos canalículos alterados exibiu uma substância granular corada em vermelho, idêntica àquela observada na zona 1 e no interior das cavidades da zona 2. Em tôrno dos canalículos notou-se uma estrutura bastante desorganizada, remanescente da dentina pericanalicular, corada em azul-avermelhado. A dentina intercanalicular, totalmente destruída, apresentou aparência grumosa, corada em azul.

A região profunda da zona 2 apresentou características algo diferentes, conforme se nota pela descrição a seguir: à medida que se aprofundaram em direção à polpa, os canalículos se tornaram menos alargados, e o seu conteúdo granular vermelho tornou-se mais compacto. Nas regiões mais profundas desta área, o conteúdo canalicular tomou a forma de um fino prolongamento, ainda granular, até se transformar em um filamento mais organizado, embora diferente daquele observado na dentina normal. A dentina pericanalicular, em tôda a região profunda da zona 2, apresentou-se morfológicamente íntegra. A dentina intercanalicular apresentou aspecto grumoso, embora menos alterada que na região superficial da zona 2, corada em azul. Os aspectos gerais das zona 1 e 2 podem ser vistos nas figuras 1, 2, 37 e 38.

Zona 3 - O exame desta região mostrou os canalículos aparentemente normais em sua morfologia, com uma fraca coloração alaranjada em seu interior. Entretanto, não houve sinais de quaisquer estruturas dentro dos canalículos. A dentina pericanalicular corou-se fortemente em vermelho-violáceo, não apresentando alterações morfológicas em sua estrutura. A dentina intercanalicular corou-se em alaranjado, também não apresentando sinais de desorganização morfológica.

Zona 4 - A dentina reparativa, nitidamente destacada da dentina normal, corou-se em azul. Os canalículos mostraram-se em pequeno número, finos e tortuosos, contendo um filamento violáceo. A dentina pericanalicular corou-se em azul intenso; a dentina intercanalicular corou-se em diversos tons azulados, mais claros - que a dentina pericanalicular. A aparência da dentina reparativa pode ser apreciada nas figuras 31 e 32.

#### 4.1.2 - Dentes descalcificados e desgastados examinados em contraste de fase.

O exame dos dentes descalcificados e desgastados em contraste de fase confirmaram os resultados morfológicos obtidos com o Tricrômico de Mallory. Destaque-se que as melhores observações morfológicas foram obtidas usando-se a água destilada (n = 1,3328) como meio de embebição. A aparência das zonas 1 e 2 em contraste de fase podem ser apreciadas na figura 3. Comprovou-se a higidez morfológica da zona 3, bem como a falta de quaisquer filamentos no interior dos canalículos dessa zona (fig. 4).

Os exames em contraste de fase forneceram, além das observações morfológicas, resultados que permitiram um cálculo aproximado dos índices de refração das estruturas da dentina cariada e normal. Estes cálculos foram baseados sobre o valor do índice de refração do meio de embebição no qual as diferentes estruturas das zonas estudadas se tornaram indistintas. Nesse momento, o índice de refração do meio é aproximadamente igual ao índice de refração das estruturas que se tornaram indistintas.

Os resultados obtidos com os diversos meios de embebição empregados, que servirão de base para os cálculos dos índices de refração das estruturas estudadas foram transferidos para os quadros I (dentes descalcificados) e II (dentes desgastados).

QUADRO I  
DENTES DESCALCIFICADOS EM CONTRASTE DE FASE

ESTRUTURA MEIO DE EMBEBIÇÃO	ZONA 1	ZONA 2		ZONA 3	ZONA 4	DENTINA NORMAL
		Região Super- ficial	Região Profun- da			
Água Destilada (n = 1,3328)						
Propilenoglicol (n = 1,4307)	Indistinta					
Glicerina pura (n = 1,4550)						
Vaselina líquida (n = 1,4615)		CC-Indistinto DI-Indistinta				
Óleo de Amêndoa (n = 1,4679)		DP-Indistinta	DI-Indistinta CC-Indistinto			
Óleo de Cedro (n = 1,5050)				CC) DI) indistintos DP)	CC) DI) indistintos DP)	CC) DI) indistintos DP)
Alfa-Bromonaftol (n = 1,6541)						

CC - Conteúdo Canalicular

DP - Dentina Pericanalicular

DI - Dentina Intercanali-  
cular

QUADRO II  
DENTES DESGASTADOS EM CONTRASTE DE FASE

ESTRUTURA MEIO DE EMBEBIÇÃO	ZONA 1	ZONA 2		ZONA 3	ZONA 4	DENTINA NORMAL
		Região Super- ficial	Região Profun- da			
Água destilada (n = 1,3328)						
Propilenoglicol ( n = 1,4307)						
Glicerina pura (n = 1,4550)	Indistinta					
Vaselina líquida (n = 1,4615)						
Óleo de Amêndoa (n = 1,4679)		DI-Indistinta				
Óleo de Cedro (n = 1,5050)		DP-Indistinta	DI-Indistinta DP-Indistinta			
Alfa-Bromonaftol (n = 1,6541)				DI-Indistinta DP-Indistinta	DI-Indistinta DP-Indistinta	DI-Indistinta DP-Indistinta

DI - Dentina Intercanalicular

DP - Dentina Pericanalicular

Observação:- o conteúdo canalicular, em dentes desgastados, não foi visível

#### 4.1.3 - Dentes descalcificados e desgastados em campo escuro

##### a) Dentes descalcificados

Dentina normal - Excetuando-se o alfa-bromonaftol, os exames efetuados nos demais meios de embebição mostraram os mesmos aspectos: canálculos com interior brilhante, dentina pericanalicular também brilhante e dentina intercanalicular totalmente negra. Com o alfa-bromonaftol, as estruturas desapareceram.

##### Dentina cariada -

Zona 1 - em água destilada, a aparência da zona 1 foi branco leitosa, homogênea (fig. 5). Essa aparência foi constante até o exame com glicerina pura. A partir dessa substância, o aspecto branco-leitoso foi escurecendo paulatinamente, até tornar-se negra com o alfa-bromonaftol.

##### Zona 2 -

Região Superficial:- os exames efetuados em água destilada mostraram o conteúdo canalicular esbranquiçado. A dentina pericanalicular exibiu remanescentes brilhantes, e a dentina intercanalicular mostrou-se escura, com algumas zonas leitosas ( Figs. 6 e 7). Este aspecto perdurou até os exames com óleo de amêndoa. A partir do óleo de cedro, as estruturas desapareceram.

Região Profunda:- Os exames efetuados desde a água destilada até o óleo de amêndoa produziram resultados semelhantes, ou sejam: conteúdo canalicular esbranquiçado, dentina pericanalicular brilhante e dentina intercanalicular totalmente negra. Em óleo de cedro, o conteúdo canalicular teve a sua aparência esbranquiçada bastante atenuada, e as demais estruturas tornaram-se negras. Com o alfa-bromonaftol, o campo todo tornou-se negro.

Zona 3 - também nesta zona os resultados foram os mesmos desde a água destilada até o óleo de amêndoa: dentina pericanalicular brilhante e conteúdo canalicular e dentina intercanalicular totalmente negros. A partir do óleo de cedro, a dentina pericanalicular perdeu nitidez, desaparecendo totalmente com o alfa bromonaftol.

Zona 4 - com exceção do alfa-bromonaftol, os exames efetuados com os demais meios de embebição mostraram resultados semelhantes: canálculos e dentina pericanalicular brilhantes, e dentina intercanalicular exibindo massas leitosas, esbranquiçadas, de direção perpendicular à direção geral dos canálculos (Fig. 33).

Esse aspecto leitoso foi diminuindo à medida que aumentou o índice de refração do meio de embebição, tornando-se quase invisível com o alfa-bromonaftol.

b) Dentes desgastados:

Os exames de dentes desgastados em campo escuro produziram resultados semelhantes àqueles relatados para os dentes descalcificados. Apenas deve-se ressaltar que o interior dos canaliculos em tôdas as áreas estudadas, apresentou-se escuro e desprovido de detalhes.

#### 4.2 - TOPOQUÍMICA

##### 4.2.1 - Métodos para Mucopolissacarídeos Ácidos

a) Basofilia metacromática com Azul de Toluidina

Conforme exposto no capítulo anterior, foram utilizados dois métodos de basofilia metacromática com Azul de Toluidina; os resultados obtidos com ambos os métodos estão expressos nos quadros III e IV.

QUADRO III

Basofilia Metacromática em cortes desidratados pelo álcool, diafani-  
zados e montados em Bálamo do Canadá

ESTRUTURA		PH	5	4	3,5	3	2,5	1,7
ZONA 1		Camada Externa	+++ Ortoocr.	+++ Ortoocr.	++	-	-	-
		Camada Interna	+++	+++	++	+	-	-
Z O N A 2	Região Super- ficial	C C	++GO	++GO	+GO	+	-	-
		D P	++	+	+	+	-	-
		D I	-	-	-	-	-	-
A 2	Região Profun- da	C C	+++GO	+++GO	++GO	+	-	-
		D P	+++	++	++	+	-	-
		DDI	++	++	-	-	-	-
ZONA 3		C C	-	-	-	-	-	-
		D P	+++	+++	++	+	-	-
		D I	+	+	-	-	-	-
J.DP.DR			+++	+++	++	+	-	-
ZONA 4		C C	++	++	++	+	-	-
		D P	+++	+++	++	+	-	-
		D I	+	+	+	-	-	-
Dentina Normal		C C	++	++	++	+	-	-
		D P	+++	+++	+++	++	-	-
		D I	+	+	+	-	-	-

Abreviações:- C C - Conteúdo Canalicular  
D P - Dentina Pericanalicular  
D I - Dentina Intercanalicular  
Ortoocr. - Ortocromasia  
G O - Granulações Ortocromáticas  
J.DP.DR - Junção Dentina Primária  
Dentina Reparativa

Metacromasia:- +++ (forte)  
++ (moderada)  
+ (fraca)  
- (negativa)

QUADRO IV

Basofilia Metacromática em cortes embebidos na própria solução corante

ESTRUTURA		PH	5	4	3,5	3	2,5	1,7
ZONA 1	Camada Externa		+++ Ortoocr.	+++ Ortoocr.	++	-	-	-
	Camada Interna		+++	+++	++	+	+	+
ZONA 2	Região Superficial	C E	+++ GO	+++ GO	++GO	+	+	+
		D P	++	+	+	+	+	-
		D I	-	-	-	-	-	-
	Região Profunda	C C	+++GO	+++GO	+++GO	++	+	+
		D P	+++	++	++	++	+	+
		D I	++	++	+	-	-	-
ZONA 3	C C	+	+	-	-	-	-	
	D P	+++	++	++	+	+	+	
	D I	+	+	+	-	-	-	
J.DP.DR			+++	+++	++	+	-	-
ZONA 4	C C	++	++	++	+	+	-	
	D P	+++	+++	+++	++	+	+	
	D I	+	+	+	-	-	-	
Dentina Normal	C C	++	++	++	+	+	-	
	D P	+++	+++	+++	++	+	+	
	D I	+	+	+	-	-	-	

Abreviações:- C C - Conteúdo Canalicular  
 D P - Dentina Pericanalicular  
 D I - Dentina Intercanalicular  
 Ortoocr. - Ortocromasia  
 G O - Granulações Ortocromáticas  
 J.DP.DR - Junção Dentina Primária  
 Dentina Reparativa

Metacromasia:- +++ (forte)  
 ++ (moderada)  
 + (fraca)  
 - (negativa)

b) Reação do Azul de Alcian pH 2,5

QUADRO V  
REAÇÕES DO AZUL DE ALCIAN pH 2,5

E S T R U T U R A		pH 2,5	
ZONA 1		Camada Externa	++
		Camada Interna	+++
Z O N	Região Superficial	C C	++
		D P	+
		D I	-
A 2	Região Profunda	C C	+++
		D P	++
		D I	+
ZONA 3		C C	-
		D P	++
		D I	-
J.DP,DR		+	
ZONA 4		C C	+
		D P	++
		D I	+
Dentina Normal		C C	+
		D P	++
		D I	+

Abreviações:- C C - Conteúdo canalicular  
 D P - Dentina pericanalicular  
 D I - Dentina intercanalicular  
 J.DP,DR - Junção Dentina Primária  
 Dentina Reparativa

Reações:- +++ (reação forte)  
 ++ (reação moderada)  
 + (reação fraca)  
 - (reação negativa)

c) Reação do Azul de Alcian pH 1

Os resultados deste método estão no quadro VI

QUADRO VI  
Reações do Azul de Alcian pH 1

E S T R U T U R A		pH 1	
ZONA 1		Camada Externa	-
		Camada Interna	+++
Z O N A 2	Região Superficial	C C	++
		D P	+
		D I	-
	Região Profunda	C C	+++
		D P	++
		D I	-
ZONA 3		C C	-
		D P	+
		D I	-
J.DP.DR			+
ZONA 4		C C	+
		D P	+
		D I	-
Dentina Normal		C C	+
		D P	+
		D I	-

Abreviações:- C C - Conteúdo canalicular  
D P - Dentina pericanalicular  
D I - Dentina intercanalicular  
J.DP.DR - Junção Dentina Primária  
Dentina Reparativa

Reações:- +++ (reação forte)  
++ (reação moderada)  
+ (reação fraca)  
- (reação negativa)

#### d) Fluorescência pela Corifosfina

Os exames efetuados com cortes fluorocromizados pela Corifosfina não tiveram seus resultados expostos sob a forma de quadros, uma vez que tornar-se-ia extremamente difícil a codificação dos aspectos apresentados pela dentina cariada e suas diversas tonalidades fluorescentes; além disso, a interpretação seria difícil, por se tratar de uma técnica recente. Julgou-se mais oportuno, nestas condições, fazer a transcrição completa dos resultados obtidos. Assim, em pH 5, observou-se:

A dentina normal exibiu, no interior dos canalículos, um filamento alaranjado. A dentina pericanalicular também mostrou forte fluorescência alaranjada. A dentina intercanalicular apresentou-se fortemente fluorescente, verde-escura.

##### Dentina Cariada:

Zona 1 - exibiu fluorescência amarelo-esverdeada, na camada externa. A camada interna, em contacto com os canalículos, apresentou fluorescência amarelo-alaranjada.

Zona 2 - apresentou os canalículos entumecidos obliterados por um material compacto, fortemente fluorescente, amarelo-alaranjado (Fig. 39). À medida que os canalículos se aprofundaram em direção pulpar, o conteúdo canalicular tornou-se menos compacto, ficando granular e exibindo fluorescência mais alaranjada (Fig. 40). Em alguns canalículos, nesta porção mais profunda, notou-se a presença dos prolongamentos de Tomes, amarelo-alaranjados. Conforme os prolongamentos se aproximaram da superfície, tornaram-se mais espessos e granulares, até se confundirem com o material compacto obliterante.

A dentina pericanalicular mostrou-se indistinta na região superficial da zona 2, onde os canalículos estão em vias de destruição. Na região profunda da zona 2, a dentina pericanalicular tornou-se visível, tendo fluorescência alaranjada.

A dentina intercanalicular, em completa desorganização, exibiu fluorescência verde-pardacenta, na porção superficial da zona 2. Na porção profunda, essa fluorescência tornou-se mais verde, mas longe da fluorescência da dentina normal.

Zona 3 - os canalículos exibiram um material ape-

nas perceptível, ténuamente fluorescente, em tonalidade alaranjada. A dentina pericanalicular mostrou fluorescência alaranjada. A dentina intercanalicular prosseguiu exibindo fluorescência verde.

Zona 4 - O limite da zona 4 com a dentina primária mostrou fluorescência amarelo-alaranjada, o mesmo acontecendo com os limites das diversas camadas da dentina reparativa. Os canalículos e a dentina pericanalicular exibiram forte fluorescência alaranjada, e a dentina intercanalicular exibiu fluorescência verde superior à da dentina normal.

Os cortes fluorocromizados com soluções tamponadas a pH 4 e 3,5 apresentaram os mesmos aspectos observados com pH 5, a não ser o conteúdo canalicular da zona 3, visível apenas até pH 4. A pH 3, houve ligeira diminuição na intensidade da fluorescência em geral.

A pH 2,5 e 1,7, a fluorescência alaranjada decresceu - bastante, embora permanecesse nos locais já assinalados.

e) Tratamento pela Hialuronidase testicular

Após a digestão promovida pela Hialuronidase testicular, os cortes foram corados pelo Azul de Toluidina, nas condições de pH costumeiras. Os resultados obtidos estão no Quadro VII.

QUADRO VII  
TRATAMENTO PELA HIALURONIDASE TESTICULAR

ESTRUTURA		pH	5	4	3,5	3	2,5	1,7
ZONA 1		Camada externa	Ortochr.	Ortochr.	Ortochr.	Ortochr.	-	-
		Camada interna	++	++	++	+	-	-
Z O N	Região Super- ficial	C C	GO	GO	GO	GO	-	-
		D P	+	+	+	+	-	-
		D I	-	-	-	-	-	-
A 2	Região Profun- da	C C	+GO	+GO	+GO	+GO	-	-
		D P	++	++	++	+	-	-
		D I	-	-	-	-	-	-
ZONA 3		C C	-	-	-	-	-	-
		D P	++	++	++	+	-	-
		D I	-	-	-	-	-	-
J.DP,DR			+	+	+	-	-	-
ZONA 4		C C	+	+	+	-	-	-
		D P	++	++	++	+	-	-
		D I	-	-	-	-	-	-
Dentina normal		C C	+	+	+	-	-	-
		D P	++	++	++	+	-	-
		D I	-	-	-	-	-	-

Abreviações:- C C - Conteúdo canalicular  
D P - Dentina Pericanalicular  
D I - Dentina Intercanalicular  
Ortochr. - Ortocromasia  
G O - Granulações Ortocromáticas  
J.DP,DR - Junção dentina Primária  
Dentina Reparativa

Metacromasia:- +++ (forte)  
++ (moderada)  
+ (fraca)  
- (negativa)

f) Reações de Bloqueio

1) Metilação - A metilação realizada conforme indicado no capítulo anterior produziu total bloqueio dos grupos carboxílicos e dessulfatação dos grupos sulfatados. Após o tratamento, os cortes corados pelo Azul de Toluidina, nas condições costumeiras, resultaram negativos.

2) Metilação + Saponificação - Os cortes corados pelo Azul de Toluidina, após metilação + saponificação, produziram os resultados contidos no Quadro VIII.

QUADRO VIII  
AZUL DE TOLUIDINA APÓS METILAÇÃO + SAPONIFICAÇÃO

ESTRUTURA		<i>pH</i>	5	4	3,5	3	2,5	1,7
ZONA 1	Camada Externa		+++ Ortoocr.	+++ Ortoocr.	++	-	-	-
	Camada Interna		+++	+++	++	-	-	-
ZONA 2	Região Superficial	C C	++GO	++GO	+GO	-	-	-
		D P	++	+	+	-	-	-
		D I	-	-	-	-	-	-
ZONA 2	Região Profunda	C C	+++GO	+++GO	++GO	-	-	-
		D P	+++	+++	++	-	-	-
		D I	++	++	+	-	-	-
ZONA 3		C C	-	-	-	-	-	-
		D P	+++	+++	++	-	-	-
		D I	+	+	-	-	-	-
J.DP.DR			+++	+++	++	-	-	-
ZONA 4		C C	++	++	++	-	-	-
		D P	+++	+++	++	-	-	-
		D I	+	+	+	-	-	-
Dentina Normal		C C	+	+	+	-	-	-
		D P	+++	+++	++	-	-	-
		D I	+	+	+	-	-	-

Abreviações:- C C - Conteúdo Canalicular  
D P - Dentina Pericanalicular  
D I - Dentina Intercanalicular  
Ortoocr. - Ortocromasia  
G O - Granulações Ortocromáticas  
J.DP.DR - Junção Dentina Primária  
Dentina Reparativa

Metacromasia:- +++ (forte)  
++ (moderada)  
+ (fraca)  
- (negativa)

#### 4.2.2 - Métodos para Polissacarídeos Neutros

##### a) Método do Ácido Periodico - Schiff (PAS)

Os resultados obtidos por meio deste método não foram colocados em Quadro, uma vez que se tornaram necessárias algumas explicações, para melhor compreensão da aparência dos cortes.

A dentina normal apresentou fraca coloração na zona intercanalicular; a dentina pericanalicular e os prolongamentos odontoblásticos são também fracamente positivos.

Zona 1 - Esta zona mostrou-se fortemente positiva, sem distinção de camadas (Fig. 12).

Zona 2 - O material interno dos canálculos exibiu forte reação positiva, na região superficial da zona 2. A dentina intercanalicular e a dentina pericanalicular também se mostraram fortemente positivas nesta região. Foram vistas com bastante nitidez as ramificações laterais dos canálculos, fortemente positivas ao PAS (Fig. 13).

Nas camadas mais profundas da zona 2, a reação ao PAS diminui na intensidade, sendo que a zona intercanalicular apresentou fraca reação positiva, o mesmo sucedendo com a dentina pericanalicular. O material interno dos canálculos e as ramificações laterais continuaram exibindo forte positividade. (Fig. 14). Uma vista geral das zonas 1 e 2 podem ser vistas na figura 15.

Zona 3 - Apresentou apenas fraca reação positiva da dentina intercanalicular.

Zona 4 - O limite dentina primária-dentina reparativa exibiu moderada reação positiva. A dentina intercanalicular mostrou fraca reação positiva, assim como os prolongamentos odontoblásticos e a dentina pericanalicular.

##### b) Reação do Ácido periodico - Schiff, após tratamento pela amilase salivar.

Os cortes submetidos à reação do PAS, após tratamento pela amilase salivar, não produziram diferença alguma, quando confrontados com os cortes-testemunha. Os aspectos foram os mesmos já relatados no método anterior.

#### 4.2.3 - Métodos para grupos protéicos

##### a) Acidofilia total pelo método de Orange G pH 1,7

No quadro IX estão sintetizados os resultados obtidos pelo método do Orange G pH 1,7.

QUADRO IX

Acidofilia total pelo método do Orange G pH 1,7

ESTRUTURA			pH 1,7
ZONA 1		Camada Externa	+++
		Camada Interna	+++
ZONA 2	Região Superficial	C C	+++G
		D P	+
		D I	+++
	Região Profunda	C C	++G
		D P	+
		D I	++
ZONA 3		C C	-
		D P	+
		D I	++
J.DP.DR			+++
ZONA 4		C C	++
		D P	++
		D I	+++
Dentina normal		C C	++
		D P	+
		D I	++

Abreviações:- C C - Conteúdo Canalicular

D P - Dentina Pericanalicular

D I - Dentina Entercanalicular

J.DP.DR - Junção Dentina Primária  
Dentina Reparativa

G - Granulações Orange G - Positivas

Coloração:- +++ (coloração forte)

++ (coloração moderada)

+ (coloração fraca)

- (coloração negativa)

## b) Determinação do ponto isoelétrico aparente

Os resultados obtidos com cortes de dentes normais e cariados, corados pelo Xileno-Cianol e pelo Azul de Toluidina, segundo o método de PISCHINGER (1926), foram colocados em gráfico, exposto a seguir.

c) Reação da Ninhidrina-Schiff para grupo amino

O exame dos cortes submetidos à reação da Ninhidrina Schiff apresentou os resultados inseridos no Quadro X.

QUADRO X

REAÇÃO DA NINHIDRINA-SCHIFF PARA GRUPO AMINO

ESTRUTURA		N - S	
ZONA 1	Camada Externa	+	
	Camada Interna	+++	
ZONA 2	Região Superficial	C C	+
		D P	-
		D I	++
	Região Profunda	C C	+
		D P	-
		D I	+
ZONA 3	C C	-	
	D P	-	
	D I	+	
J.DP,DR		-	
ZONA 4	C C	+	
	D P	-	
	D I	+	
Dentina Normal	C C	+	
	D P	-	
	D I	+	

Abreviação:- C C - Conteúdo Canalicular

D P - Dentina Pericanalicular

D I - Dentina Intercanalicular

J.DP,DR - Junção Dentina Primária  
Dentina Reparativa

Reação:- +++ (reação forte)

++ (reação moderada)

+ (reação fraca)

- (reação negativa)

d) Reação de Sakaguchi para grupo guanidil

Os cortes submetidos à reação de Sakaguchi, para evidência do grupo guanidil, mostraram apenas fraca reação positiva na região correspondente à zona 1.

e) Desaminação

Após desaminação, os cortes, acompanhados dos cortes - testemunha, foram corados pelo Orange G pH 1,7. Os resultados estão no quadro XI.

QUADRO XI  
CORTES DESAMINADOS E CORTES-TESTEMUNHA, CORADOS  
PELO ORANGE G pH 1,7

ESTRUTURA			Cortes Desaminados	Cortes Testemunha
ZONA 1	Camada Externa		+	+++
	Camada Interna		+	+++
ZONA 2	Região Superficial	C C	+ G	+++ G
		D P	+	+
		D I	++	+++
	Região Profunda	C C	+ G	++ G
		D P	+	+
		D I	+	++
ZONA 3	C C	-	-	
	D P	+	+	
	D I	+	++	
J.DP.DR			+	+++
ZONA 4	C C		+	++
	D P		+	++
	D I		+	+++
Dentina Normal	C C		+	++
	D P		+	+
	D I		+	++

Abreviações:- C C - Conteúdo Canalicular  
D P - Dentina Pericanalicular  
D I - Dentina Intercanalicular  
J.DP.DR.- Junção Dentina Primária  
Dentina Reparativa  
G - Granulações Orange G - Positivas

Coloração:- +++ (coloração forte)  
++ (coloração moderada)  
+ (coloração fraca)  
- (coloração negativa)

#### 4.2.4 - MÉTODO PARA LIPÍDEOS

Foram usados para êste método dentes fixados em formol-cálcio, cortados por congelação e corados pelo Sudan-Black. Além das costumeiras zonas de cárie estudadas, procurou-se localizar a "zona de degeneração gordurosa dos prolongamentos de Tomes", citada por KRONFELD (1955 a). Segundo êste autor, tal zona estaria situada imediatamente abaixo da zona de esclerose dos canalículos.

A dentina normal apresentou fraca reação positiva da dentina pericanalicular e dos prolongamentos de Tomes.

Zona 1 - esta zona reagiu fortemente ao corante, corando-se por igual, sem distinção de camada (Fig. 18).

Zona 2 - a região superficial da zona 2 mostrou o material intracanalicular bastante corado, destacando-se granulações em tudo semelhantes àquelas encontradas nos exames de basofilia - (onde são ortocromáticas) e de acidofilia total. A dentina pericanalicular e intercanalicular não se coraram (Fig. 18).

Na região profunda da zona 2, o material interno dos canalículos corou-se fortemente, apresentando também as granulações. A dentina pericanalicular corou-se fracamente, e a intercanalicular não se corou.

Zona 3 - apresentou apenas fraca coloração da dentina pericanalicular.

Zona 4 - o limite entre as dentinas primária e reparativa não apresentou positividade. Os prolongamentos de Tomes e a dentina pericanalicular apresentaram fraca reação positiva, enquanto a dentina intercanalicular permaneceu sem coloração.

Quanto à zona de degeneração gordurosa dos prolongamentos de Tomes, ela não foi delimitada nesta pesquisa, pois as reações fracamente positivas dos prolongamentos são vistas mesmo na dentina normal, não havendo, portanto, possibilidade de diferenciação.

#### 4.3 - ULTRAESTRUTURA

##### 4.3.1 - Dicroísmo

O dicroísmo observado nos cortes corados pelo Azul de Toluidina a 0,05%, pH 4, apresentou as seguintes características:

A coloração metacromática observada na dentina intercanalicular normal apresentou-se mais intensa quando os canalículos

estavam paralelos ao PPL (plano de polarização da luz). Quando os canalículos estavam perpendiculares ao PPL, a metacromasia diminuiu bastante, tomando uma tonalidade azulada.

Não foi possível detectar dicroísmo na dentina pericanalicular normal, nem no interior dos canalículos.

Em cortes de dentes cariados, não se observou dicroísmo em nenhuma das zonas afetadas pela cárie. A dentina reparativa, entretanto, exibiu dicroísmo no mesmo sentido da dentina normal, - mais evidente até, em virtude da maior área da dentina intercanalicular.

#### 4.3.2 - Birrefringência

Conforme exposto no capítulo precedente, os exames de birrefringência foram realizados usando-se 3 meios de embebição: - água destilada ( $n = 1,3328$ ), óleo mineral puro ("Nujol"  $n=1,4799$ ) e alfa-bromonaftol ( $n = 1,6541$ ). Esta medida foi tomada para verificar-se a variação da birrefringência de forma em função de diferentes índices de refração.

Os cortes descalcificados produziram melhores resultados quando embebidos em água destilada, enquanto os dentes desgastados foram melhor observados em óleo mineral puro. O alfa-bromonaftol tornou as estruturas birrefringentes embaçadas e indistintas, pois o seu índice de refração é elevado e próximo ao índice de refração das estruturas da dentina. Desta maneira, os dados expostos a seguir são aqueles obtidos através dos exames em água destilada (dentes descalcificados) e óleo mineral puro (dentes desgastados).

##### a) Birrefringência em dentes descalcificados

Dentina normal: - apresentou forte birrefringência da área intercanalicular. Esta birrefringência estava orientada em sentido perpendicular aos canalículos. No ponto de extinção, a dentina intercanalicular exibiu ainda uma fraca birrefringência. - Em cortes transversais, a dentina normal apresentou um curioso aspecto birrefringente, formando pequenas figuras em forma de cruz, concentradas principalmente na região intercanalicular (Fig. 19). Fazendo-se uma rotação de 0,5 graus no analisador, as figuras cruciformes desapareceram, tornando-se mais evidente a birrefringência na área intercanalicular, perpendicular aos canalículos, e também a birrefringência no interior dos canalículos (Fig. 20). Em aumento maior notou-se com maior riqueza de detalhes a birrefringência apresenta

da pela dentina intercanalicular (sempre perpendicular aos canalículos) e também a birrefringência da dentina pericanalicular e do interior dos canalículos (Fig. 21).

Dentina Cariada:-

Zona 1 - esta zona apresentou-se moderadamente birrefringente, sem definição de estruturas, estando orientada em sentido paralelo à superfície do dente (Fig. 22). No ponto máximo de extinção, esta zona ainda apresentou fraca birrefringência (Fig. 23).

Zona 2 - a região superficial da zona 2 mostrou fraca birrefringência da porção correspondente à dentina intercanalicular. Esta birrefringência tinha aspecto pastoso e sentido perpendicular aos canalículos. Estes mostraram conteúdo apenas perceptível. A dentina pericanalicular remanescente exibiu restos fracamente birrefringentes. Nas áreas mais profundas da zona 2, a birrefringência de aspecto pastoso da dentina intercanalicular ainda foi notada, embora menos acentuada. Em virtude disso, a birrefringência da região intercanalicular mostrou-se mais intensa que na região anterior. A dentina pericanalicular mostrou fraca birrefringência, visível ainda no ponto de extinção. O conteúdo canalicular exibiu fraca birrefringência.

Zona 3 - esta zona mostrou marcada birrefringência da dentina intercanalicular, superior mesmo àquela apresentada pela dentina normal; os canalículos não mostraram birrefringência no seu interior. A dentina pericanalicular apresentou birrefringência fraca. Torna-se necessário frisar que a dentina esclerosada tem a sua intensidade máxima de birrefringência numa posição que difere em cerca de  $30^{\circ}$  da posição de intensidade máxima de birrefringência da dentina normal.

Zona 4 - o limite entre a dentina primária normal e a dentina reparativa não se diferenciou. A dentina intercanalicular da zona 4 apresentou birrefringência forte, orientada perpendicularmente aos canalículos. O interior dos canalículos exibiu moderada birrefringência, assim como a dentina pericanalicular, que é birrefringente mesmo no ponto de extinção.

Finalmente, resta destacar que alguns cortes descalcificados não foram submetidos à desparafinação, sendo examinados nesse estado. Estes exames foram feitos com a finalidade de se demonstrar um fenômeno existente no interior dos canalículos da dentina normal, que apresentam uma figura em forma de cruz quando cortados transversalmente. Esta figura não deve ser confundida -

com aquela apresentada pela dentina normal, em cortes desparafinados. Após a desparafinação, o interior dos canalículos não mais a presentam tal figura. Este 'é um exemplo da verdadeira "cruz de polarização" e pode ser apreciada da figura 24.

b) Birrefringência em dentes desgastados

-Dentina normal:- A dentina normal apresentou forte birrefringência da zona intercanalicular, orientada preponderantemente em direção perpendicular aos canalículos. A posição máxima de extinção provocou uma queda brusca da intensidade da birrefringência, embora não haja completo desaparecimento. O interior dos canalículos não mostrou birrefringência. A dentina pericanalicu--lar exibiu fraca birrefringência, que persistiu mesmo no ponto máximo de extinção da zona.

Dentina cariada:-

Zona 1 - apresentou moderada birrefringência, em sentido paralelo à superfície dental. Esta birrefringência mostrou--se indistinta e pastosa, semelhante àquela observada nos cortes -descalcificados (Figs. 25 e 26). Na posição de extinção, a zona 1 sofreu uma queda acentuada na intensidade de birrefringência, - que, entretanto, não desaparece totalmente (Fig. 27 e 28).

Zona 2 - a região superficial da zona 2 mostrou fraca birrefringência pastosa, indistinta, na área correspondente à dentina intercanalicular, com sentido perpendicular aos canalículos. Estes, alargados, foram de difícil visualização, em virtude do aspecto indefinido da zona, mostrando-se escuros. A dentina pericanalicular exibiu remanescentes fracamente birrefringentes. A região profunda da zona 2 mostrou birrefringência mais acentuada - da dentina intercanalicular, embora ainda fraca e indefinida. A direção geral da birrefringência foi perpendicular aos canalícu--los; essa birrefringência, entretanto, não desapareceu de todo, mesmo no ponto de extinção da zona. Os canalículos alterados não mostraram birrefringência em seu interior. A dentina pericanalicular mostrou-se moderadamente birrefringente, sendo visível mesmo no ponto de extinção.

Zona 3 - A dentina esclerosada mostrou, na área intercanalicular, um aumento de birrefringência, em relação à dentina normal. A orientação dessa birrefringência diferiu daquela das zonas circunvizinhas, conforme já explicado nos dentes descalficados. O conteúdo canalicular não apresentou birrefringência. A

dentina pericanalicular mostrou moderada birrefringência, que persistiu fracamente no ponto de extinção.

Zona 4 - o limite entre a dentina primária normal e a dentina reparativa não se diferenciou. A área intercanalicular mostrou-se fortemente birrefringente, em sentido perpendicular aos canalículos. Mesmo no ponto de extinção, a birrefringência dessa área ainda persistiu, embora menos acentuada. Os canalículos, finos e tortuosos, não permitiram maiores detalhes do seu interior. A dentina pericanalicular apresentou-se moderadamente birrefringente, sendo que essa birrefringência persistiu fracamente no ponto de extinção.

c) Birrefringência em dentes descalcificados, com compensador de gesso vermelho de primeira ordem.

Este tipo de exame não produziu bons resultados, provavelmente em virtude da pequena espessura dos cortes. As imagens confundiram-se com o fundo do campo, tornando de pouca valia as interpretações.

d) Birrefringência em dentes desgastados, com compensador de gesso vermelho de primeira ordem.

Estes exames foram realizados na direção gama do eixo de propagação da luz, ou seja, na direção de lenta propagação do feixe luminoso. Nestas condições,  $N_e$  (índice de refração do raio extraordinário) é maior que  $N_o$  (índice de refração do raio ordinário) no quadrante positivo. Quando forem modificadas estas condições, isso será citado.

Dentina normal:- a dentina normal mostrou forte birrefringência azul de 2ª ordem, da zona correspondente à dentina intercanalicular. A dentina pericanalicular mostrou-se azul de 2ª ordem, com algumas zonas amarelas de 1ª ordem, irregulares. O conteúdo canalicular, apresentou-se escuro e sem detalhes.

Dentina cariada:-

Zona 1 - esta zona apresentou-se predominantemente azul de 2ª ordem, embora tenham sido notadas algumas zonas esparsas amarelas de 1ª ordem e também algumas áreas escuras.

Zona 2 - a região superficial da zona 2 apresentou fraca birrefringência azul de 2ª ordem, escura, na porção correspondente à área intercanalicular. Também foram notadas pequenas porções amarelas de 1ª ordem. Os remanescentes da dentina pericanalicular apresentaram fraca tonalidade azul de 2ª ordem, entremeada com alguns locais amarelos de 1ª ordem, muito dificilmente

notados. O conteúdo canalicular apresentou-se escuro, com alguns pontos brilhantes. A região profunda da zona 2 apresentou fraca birrefringência azul de 2ª ordem, pouco mais acentuada que a área anterior. A dentina pericanalicular exibiu predominância da tonalidade azul de 2ª ordem, e áreas amarelas irregularmente distribuídas. O conteúdo canalicular foi escuro, com poucos pontos brilhantes.

Zona 3 - a dentina intercanalicular apresentou-se predominantemente amarela de 1ª ordem, diferindo portanto das demais áreas da dentina. Examinando-se esta zona na direção de rápida propagação do raio luminoso, no quadrante negativo, a dentina intercanalicular se tornou predominantemente azul de 2ª ordem. Estes dois aspectos podem ser vistos nas figuras 41 e 42. Saliente-se que a birrefringência apresentada pela dentina esclerosada é superior àquela da dentina normal. A dentina pericanalicular também se mostrou possuidora do mesmo fenômeno acima relatado, embora a sua visualização seja mais difícil. O conteúdo canalicular mostrou-se escuro, sem tonalidade definida.

Zona 4 - o limite entre a dentina primária normal e a dentina reparativa não se diferenciou. A dentina intercanalicular mostrou forte birrefringência azul de 2ª ordem, intercalada com algumas zonas amarelas de 1ª ordem. A dentina pericanalicular mostrou aspectos semelhantes, embora a sua birrefringência fôsse mais fraca. O conteúdo canalicular exibiu-se escuro, sendo difícil a sua correta observação, em virtude da extrema exiguidade da luz dos canaliculos.

#### 4.4 - COLORAÇÃO BACTERIOLÓGICA

O objetivo dêste trabalho, evidentemente, não foi o de pesquisar o problema das bactérias e o seu papel na produção da cárie dental, mas apenas e tão somente evidenciar a sua localização na dentina cariada, bem como ter-se uma idéia da sua quantidade nas zonas invadidas:

Cortes corados com o método de Gram para tecidos revelaram o seguinte:

Zona 1) em toda a sua extensão, esta zona apresentou-se cheia de bactérias, reunidas principalmente em grandes aglomerados. A grande maioria dêstes aglomerados estava constituída de cocos Gram positivos (Fig. 29).

Zona 2) a região superficial da zona 2 mostrou os canaliculos distendidos-obliterados por um grande número de microorganismos, na maioria cocos Gram-positivos. As cavidades desta zona, também se apresentaram cheias de microorganismos (Fig. 30). Também foram notados microorganismos nas ramificações laterais dos canaliculos. Na região profunda da zona 2, o número de bactérias decresceu consideravelmente, estando os microorganismos localizados apenas no interior dos canaliculos e em algumas ramificações.

Zonas 3 e 4) estas zonas não apresentaram bactérias, na imensa maioria dos cortes examinados.

\*

\* \*

## 5 - DISCUSSÃO

A discussão dos resultados será feita, em uma primeira parte, em relação às zonas de cárie propriamente ditas. A discussão dos resultados obtidos sobre a dentina reparativa será feita à parte, no final do capítulo.

### 5.1 - ESTUDOS MORFOLÓGICOS

#### 5.1.1 - Dentes descalcificados corados pelo Tricrômico de Mallory.

Deve-se esperar, dos resultados obtidos por este método, pouco mais do que algumas observações da morfologia das zonas cariadas. Um dos pontos que chamam a atenção é a coloração diferente da zona cariada, quando comparada com a dentina normal. Nos nossos resultados, as diferenças de coloração poderiam ser interpretadas como modificações teciduais que alteram as propriedades tintoriais do tecido. TOTO (1966) referiu-se à reação positiva do colágeno da zona cariada da dentina ao tricrômico de Mallory, o que foi confirmado nesta pesquisa.

Também merece citação o fato de a dentina pericanalicu lar, na região superficial da zona 2, estar ainda presente, embora mostre sinais de profunda desorganização. A grande maioria dos autores afirma que a matriz pericanalicular é atacada pelo processo carioso antes da matriz intercanalicular, e que somente após a destruição daquela se processariam as alterações desta. Os resultados obtidos através do método de Mallory indicaram maior alteração morfológica da matriz intercanalicular. Como esta técnica não fornece maiores detalhes que aqueles puramente morfológicos, este ponto será discutido posteriormente, com maiores detalhes.

Finalmente, este método permitiu a visualização da gradual transformação do prolongamento odontoblástico em um material amorfo, que obstrui os canaliculos intumescidos da zona 2.

#### 5.1.2 - Dentes descalcificados e desgastados examinados em contraste de fase

O contraste de fase baseia-se no princípio de transformação de diferenças de fase de um objeto em diferenças de amplitude, que resulta em diferenças de claridade de imagem.

Estas diferenças de luminosidade permitem um exame morfológico bastante detalhado, principalmente em dentes descalcifi

cados, cuja espessura é fina e uniforme. Os dentes desgastados - muito mais espessos, são mais valiosos para a determinação dos índices de refração aproximados das estruturas.

Desta maneira, os dentes desgastados e descalcificados confirmaram o aspecto morfológico da zona 1, totalmente desorganizada, composta quase exclusivamente de restos orgânicos. O índice de refração desta zona está por volta de 1,4307 (dentes descalcificados) e 1,4550 (dentes desgastados). Como se pode notar, existe uma pequena diferença entre os dois tipos de dentes examinados, o que se pode levar à conta do processo de descalcificação, que retira uma fração da estrutura da dentina. Como a zona 1 é composta quase exclusivamente de restos orgânicos, essa diferença entre os dentes descalcificados e desgastados não foi muito grande.

Na região superficial da zona 2, onde as estruturas dentinárias estão em processo de desorganização, os resultados indicaram que a dentina intercanalicular possui um índice de refração que está por volta de 1,4615 nos dentes descalcificados e 1,4679 nos dentes desgastados. KAYE e HEROLD (1966) encontraram para a dentina intercanalicular normal, um valor situado entre 1,7132 e 1,8699. VIDAL (1967) achou, para a dentina intercanalicular normal, um valor entre 1,5218 - 1,5380 (perpendicularmente ao longo eixo dos canaliculos) e 1,5225-1,5343 (paralelamente ao longo eixo dos canaliculos). É opinião do autor desta pesquisa que os valores encontrados por KAYE e HEROLD são demasiado altos; os resultados de VIDAL são mais concordes com aqueles encontrados nesta pesquisa. Levando-se em consideração a profunda desorganização da dentina intercanalicular, na região superficial da zona 2, os valores encontrados neste trabalho parecem razoáveis.

O contraste de fase evidenciou, principalmente nos dentes descalcificados, remanescentes da dentina pericanalicular na região superficial da zona 2. Embora esta estrutura seja, na opinião de muitos autores (PROPHET, 1954; BRADFORD, 1958 a; TAKUMA e KURAHASHI, 1962; FRANK e col., 1964; MACHA e col., 1966) destruída antes da dentina intercanalicular, os resultados desta pesquisa não são concordes com tal afirmação. Pelo contrário, tudo parece indicar que a dentina pericanalicular está mais preservada que a dentina intercanalicular, mesmo nas zonas mais desorganizadas.

Estes resultados, aliás, concordam com os encontrados por BRAD - FORD (1960), JOHANSEN (1960), BANEZ e JOHANSEN (1964) e HABERMAN e cola. (1967). Nos dentes descalcificados, o índice de refração da dentina pericanalicular está situado por volta de 1,4679. Nos dentes desgastados, esse valor está ao redor de 1,5050. VIDAL (1967) encontrou, para a dentina pericanalicular normal um valor situado entre 1,5168-1,5272 (perpendicularmente aos canalículos) e 1,5155-1,5195 (paralelamente aos canalículos). Como se pode notar, a dentina pericanalicular cariada sofreu uma redução do seu índice de refração, comparativamente à dentina normal, fato que sucedeu também com a dentina intercanalicular.

Quanto ao conteúdo canalicular da região superficial da zona 2, os resultados indicam, nos dentes descalcificados, um índice de refração ao redor de 1,4615. VIDAL (1967) encontrou, para o interior dos canalículos da dentina normal, um valor situado entre 1,4787 (paralelamente ao longo eixo dos canalículos) e 1,4797 (perpendicularmente ao longo eixo dos canalículos). Também no interior dos canalículos da dentina cariada existe uma queda do valor do índice de refração, quando comparado com o interior dos canalículos da dentina normal. Ressalte-se que não é possível calcular o índice de refração do interior dos canalículos dos dentes desgastados, provavelmente em virtude da perda de material no processo de desgaste.

A região profunda da zona 2, morfológicamente menos desorganizada que a região anterior, apresentou os seguintes resultados: para a dentina intercanalicular obteve-se um valor ao redor de 1,4679 para os dentes descalcificados e 1,5050 para os dentes desgastados. A dentina pericanalicular apresentou valores em volta de 1,5050 para os dentes descalcificados e desgastados, o que vem reforçar a hipótese de que a dentina pericanalicular é pouco afetada nas regiões profundas da cárie. O interior dos canalículos, nos dentes descalcificados, tem o seu índice de refração ao redor de 1,4679. Como se nota, nas regiões menos alteradas pela cárie, o índice de refração das estruturas é mais elevado, aproximando-se mais dos valores da dentina normal.

A dentina esclerosada, com exceção do interior dos canalículos, não demonstrou sinais de alteração morfológica. O contraste de fase mostrou aspectos semelhantes, no que tange aos índices de refração, da dentina intercanalicular, pericanalicular e do interior dos canalículos. Os valores dos índices de refração destas

estruturas, tanto em dentes descalcificados como em dentes desgastados, foram semelhantes, estando situados entre 1,5050 e 1,6541, ou seja, dentro de um intervalo onde se colocam os valores obtidos por VIDAL para as estruturas da dentina normal, o que parece comprovar que a dentina esclerosada é pouco afetada em sua integridade morfológica. Deve-se excetuar das considerações acima o interior dos canalículos, que demonstraram, na dentina esclerosada, possuir um índice de refração superior ao índice de refração do interior dos canalículos da dentina normal. Levando-se em conta o fato de que o interior dos canalículos da dentina esclerosada está obliterado por material calcificado, essa elevação do seu índice de refração parece explicado.

### 5.1.3 - Dentes descalcificados e desgastados examinados em campo escuro.

A microscopia de campo escuro baseia-se na iluminação oblíqua sobre um objeto a examinar, iluminação essa incidente sobre todos os lados do objeto, excluindo-se a iluminação direta. - Este processo permite a visualização de detalhes que podem passar despercebidos em iluminação comum e até mesmo em contraste de fase.

A discussão dos resultados obtidos através deste método, torna-se problemática, uma vez que não há notícias de trabalhos sobre dentina cariada neste campo. Os exames dos dentes descalcificados e desgastados permitiu a perfeita visualização da zona 1, - branco-leitosa homogênea. Conforme se depreende da análise dos resultados, a tonalidade branco-leitosa da zona 1 foi se esmaecendo à medida que se elevava o índice de refração do meio de embebição. É bastante provável que, como a zona 1 parece ser constituída predominantemente de matéria orgânica, o meio de embebição penetre na estrutura, tornando-a gradativamente indistinta, conforme diminui a fluidez dos meios de embebição. Isto porém não afasta a hipótese de que também o exame em campo escuro sofra, de uma maneira direta, a influência do índice de refração.

A região superficial da zona 2 apresentou, tanto nos dentes descalcificados como desgastados, um aspecto algo leitoso da dentina intercanalicular, semelhante à aparência da zona 1. Isto parece reforçar a hipótese de uma profunda descalcificação desta estrutura nesta área. O conteúdo canalicular, esbranquiçado, confirma a sua natureza predominantemente orgânica. A presença de remanescentes da dentina pericanalicular evidenciam a sua grande resistência.

A região profunda da zona 2 mostrou o mesmo aspecto do

conteúdo canalicular, esbranquiçado; a dentina pericanalicular, - nestas regiões, mostrou-se íntegra, reforçando a teoria de sua - maior resistência à cárie, quando comparada à dentina normal. A dentina intercanalicular não mostrou, nesta área, aspecto branco-leitoso, o que demonstra que a descalcificação não atingiu um estágio adiantado.

A dentina esclerosada confirmou a sua integridade morfológica, tanto da dentina intercanalicular como da pericanalicular. A aparência do interior dos canálculos foi semelhante à da dentina intercanalicular, sugerindo que existe um material mais mineralizado obliterando os canálculos.

## 5.2 - TOPOQUÍMICA

### 5.2.1 - Métodos para Mucopolissacarídeos ácidos

#### a) Basofilia metacromática com Azul de Toluidina

Os quadros III e IV refletem os resultados obtidos - pelos exames de basofilia metacromática nas duas técnicas utilizadas. Da análise destes quadros, deduz-se que a metacromasia dos - cortes examinados na própria solução corante fornece melhores resultados. Os cortes desidratados pelo álcool não produziram resultados positivos abaixo de pH 3,6, enquanto os cortes embebidos na própria solução corante revelaram em algumas zonas, metacromasia, mesmo em pH 1,7. Isso demonstra que o álcool produz alterações na coloração metacromática. Desta maneira essa discussão será baseada nos resultados do quadro IV.

A zona 1 apresentou duas camadas de reações diferentes. A camada mais externa mostrou predominância de áreas fortemente ortocromáticas, entremeadas com algumas áreas metacromáticas. A ortocromasia desapareceu a pH 3,5, enquanto a metacromasia persistiu, fracamente, até pH 3,0. As áreas ortocromáticas representam provavelmente, regiões onde a desorganização estrutural atingiu a estruturação macromolecular, mudando a configuração e a disposição de grupos polares das moléculas. Por outro lado, podem ter-se corado substâncias oriundas de atividades bacterianas.

A forte metacromasia observada a pH 5,0 na camada interna da zona 1 não indica obrigatoriamente que ela seja devida somente a mucopolissacarídeos ácidos, uma vez que outras substâncias são metacromáticas a esse nível, não havendo especificidade.

Quanto à distinção entre mucopolissacarídeos carboxílicos e sulfatados, tem-se a comentar o seguinte: empregando-se o Azul de Toluidina para essa distinção, segundo SPICER (1960), a

basofilia pH 1,5 teria o mesmo significado que a basofilia do Azul de Alcian a pH 1 (específica para radicais sulfatados). MUNHOZ - (1967) considerou, em seu trabalho sobre glândulas salivares, que o Azul de Toluidina a pH 2,2 teria o mesmo efeito do Azul de Alcian empregado a pH 1.

LANDSMEER, citado por LISON (1960 g), considerou que as estruturas que se coram metacromáticamente abaixo de pH 3,4 contém grupos fortemente ácidos, como fosfato e principalmente sulfatos.

Como se vê, as opiniões dos autores não coincidem, variando de trabalho para trabalho. A dentina, sendo um tecido onde os mucopolissacarídeos ácidos não se encontram em estado livre, e sim ligados a outras substâncias, não apresenta a mesma facilidade em exibir metacromasia, como por exemplo, glândulas, onde os mucopolissacarídeos ácidos se encontram em estado mais detectável.

Levando-se em conta essas considerações, atribuiu-se à metacromasia obtida a pH 3 ou inferior, como sendo devida a mucopolissacarídeos ácidos contendo radicais sulfato; acima de pH 3 até pH 4, a metacromasia se deve à mistura de mucopolissacarídeos ácidos carboxílicos e sulfatados. Os testes de metilação seguida de saponificação e a digestão pela Hialuronidase, testicular confirmaram essas afirmações, como será discutido adiante.

Assim sendo, a positividade da camada interna da zona 1 ao Azul de Toluidina em todos os pH realizados indicam a presença de mucopolissacarídeos ácidos dos tipos carboxílico e sulfatado.

A região superficial da zona 2 acusou metacromasia do material interno dos canalículos, além de pequenas granulações ortocromáticas. Quanto à origem do material intracanalicular, os elementos são insuficientes para que se possa fazer uma afirmação definitiva. Se esse material provém de restos dos prolongamentos odontoblásticos ou das paredes canaliculares, ou de ambos, é uma questão que permanece no terreno das hipóteses. Tomando-se por base os exames morfológicos com o Tricrômico de Mallory, parece razoável que esse material provenha, em sua maior parte, dos restos dos prolongamentos odontoblásticos. Contudo, não se deve esquecer que substâncias exógenas devem estar presentes, representadas pelas bactérias e seus produtos de metabolismo.

A reação metacromática desse material intracanalicular permanece positiva mesmo a pH 1,7, o que indica seja ela devida a uma mistura de mucopolissacarídeos ácidos carboxílicos e sulfatados, além de outras substâncias.

Além dessa substância amorfa intracanalicular, foi notada a presença de granulações ortocromáticas, citadas por BRADFORD (1957); tais granulações, segundo este autor, não devem ser confundidas com bactérias, com o que se pode concordar plenamente. VIDAL (1961), relatou que essas granulações pareciam ser constituídas de proteínas, carboidratos e mucopolissacarídeos ácidos. O autor deste trabalho não constatou reação positiva nessas granulações, com nenhum método específico para mucopolissacarídeos ácidos.

A dentina pericanalicular na região superficial da zona 2, embora desagregada, permaneceu exibindo metacromasia até pH 2,5. A reação metacromática é de intensidade moderada, mesmo aos níveis mais altos de pH. A dentina pericanalicular normal exibiu forte metacromasia até pH 3,5, o que corrobora os achados de SYMONS (1960). Nesta região da zona 2, a metacromasia da dentina pericanalicular decresceu em intensidade, provavelmente em virtude do seu estado de desagregação estrutural e consequente despolimerização.

Constatou-se, nesta pesquisa, a perda de intensidade metacromática da dentina cariada, que é mais evidente na região intercanalicular. SOGNAES e WISLOCKI (1950), ENGEL (1950), MARTENS e col. (1959) e MACHA e col. (1966) afirmaram que há uma diminuição geral de metacromasia na zona cariada. De conformidade com os resultados desta pesquisa, a afirmação dos autores acima é verdadeira somente no que concerne às dentinas intercanalicular e pericanalicular, já que o material intracanalicular tem a sua metacromasia aumentada.

A metacromasia da dentina intercanalicular da região superficial da zona 2 desapareceu completamente, mesmo aos níveis mais elevados de pH. Tal fato confirma que nessa zona houve uma perda notável de mucopolissacarídeos ácidos, levando-se em conta a metacromasia da dentina normal, que permanece metacromática até pH 3,5.

SOGNAES e WISLOCKI (1950), ENGEL (1950), MARTENS e col. (1959), MACHA e col. (1966) e TOTO (1966), são unânimes em afirmar que ocorre na dentina cariada, uma despolimerização de mucopolissacarídeos ácidos, devida às atividades despolimerizantes do processo cariioso. Embora esse fato seja confirmado pelos resultados da presente pesquisa, ele somente ocorre em sua plenitude nas zonas onde a desagregação das estruturas está completamente estabelecida, como no caso da região superficial da zona 2.

No presente trabalho observou-se um aumento geral da metacromasia na região profunda da zona 2, que é uma zona onde as alterações resultantes do processo de cárie já se fazem notar, embora menos severamente. É fato conhecido que as macromoléculas de mucopolissacarídeos ácidos estão intimamente associadas ao colágeno (VIDAL, 1964 a, BANGA e BALÓ, 1965). Como o equilíbrio deste complexo é rompido através dos mecanismos destrutivos do processo cariioso (ENGEL, 1950), as macromoléculas de mucopolissacarídeos ácidos serão dissociadas das proteínas. Desta maneira, muitos radicais que fazem parte das moléculas de mucopolissacarídeos ácidos tornar-se-ão livres, produzindo um aumento da metacromasia nesta altura. Este fato parece ocorrer nas regiões profundas da zona 2, onde a atividade destrutiva da cárie não produziu destruição total. Com o evoluir do processo, os mucopolissacarídeos ácidos sofrem despolimerização, reduzindo-se as frações mais simples, condição que os torna pouco ou não detectáveis. Neste ponto, é evidente que a metacromasia diminui ou mesmo desaparece, de conformidade com o estado de agregação da estrutura. É provável que seja este o mecanismo segundo o qual a região superficial da zona 2 perde as suas propriedades metacromáticas.

A dentina pericanalicular, na região profunda da zona 2 mostrou metacromasia mais intensa que aquela apresentada pela região superficial da mesma zona; ao mesmo tempo, é pouco menos metacromática que a correspondente da dentina normal. Isso demonstra que os mucopolissacarídeos ácidos começam a sofrer despolimerização, embora a dentina pericanalicular não demonstre outros sinais de alteração, estando, inclusive, morfológicamente íntegra. O material intracanalicular nesta região é mais metacromático que aquele observado na região superficial, o que indica início de alterações no interior dos canalículos.

A dentina esclerosada foi estudada histoquimicamente por SYMONS (1960), que a chamou de dentina cromófoba. Segundo este autor, somente a região imediatamente periférica ao canalículo dentinário exhibe metacromasia ao Azul de Toluidina. Os resultados desta pesquisa indicaram fraca reação positiva da dentina intercanalicular até ao nível de pH 3,5, o que pode indicar a presença de mucopolissacarídeos ácidos. Aliás, a dentina intercanalicular normal apresentou os mesmos resultados, o que sugere que a porção intercanalicular da dentina esclerosada não sofreu alterações, pelo menos no que tange às suas propriedades metacromáticas. No in-

terior dos canaliculos da zona 3, não foram notados os prolongamentos odontoblásticos, nem qualquer material obliterante; foi detectada apenas uma tênue sombra metacromática, a pH 5 e 4, não tendo portanto maior significado histoquímico.

A dentina pericanalicular da zona 3 apresentou reação metacromática a todos os níveis de pH; a coloração, entretanto, é menos intensa do que do que aquela da dentina normal, o que indica certa perda de mucopolissacarídeos ácidos.

MACHA e col. (1966) relataram que a dentina esclerosada sofre uma perda de mucopolissacarídeos ácidos menor que a perda sofrida pela dentina cariada, fato êsse concorde com os resultados da presente pesquisa. Também foi afirmado por êsses autôres - que existe um halo de positividade à metacromasia no limite externo da zona pericanalicular. Na presente pesquisa, entretanto, encontrou-se reação metacromática positiva em tôda a dentina pericanalicular.

#### b) Reações do Azul de Alcian pH 2,5

Êste método foi preconizado por LISON (1954) para coloração de glúcídeos contendo radicais com função ácida, sem distinção de grupos. O confronto dos resultados obtidos pelo Azul de Alcian pH 2,5 com aqueles obtidos através da basofilia metacromática com Azul de Toluidina (Quadro IV) sugere que as reações do Azul de Alcian pH 2,5 são sensivelmente semelhantes às reações do Azul de Toluidina pH 3,5. Confirma-se desta maneira que a reação do Azul de Alcian pH 2,5 é positiva para mucopolissacarídeos ácidos de uma maneira geral.

A zona 1 mostrou-se positiva ao Azul de Alcian pH 2,5, sendo comprovada a presença de mucopolissacarídeos ácidos, particularmente na camada interna.

SYMONS (1961), trabalhando com a dentina normal, usou o Azul de Alcian a pH 2,6 e relatou que a dentina intercanalicular era muito fracamente corada. Os resultados da presente pesquisa, na dentina normal, confirmaram a afirmação de SYMONS. Nas zonas cariadas, não houve coloração da dentina intercanalicular - da região superficial da zona 2; na região profunda, esta estrutura apresentou reação positiva. Isto comprova o aumento de metacromasia verificada neste local.

A dentina pericanalicular normal, segundo SYMONS (1962)

cora-se profundamente com Azul de Alcian pH 2,6. Os resultados do presente trabalho para a dentina pericanalicular normal são semelhantes, embora a coloração não tenha sido forte, tendendo mais para moderada. Nas zonas cariadas, a dentina pericanalicular exibiu fraca reação na região superficial da zona 2, e reação de moderada para forte na região profunda da mesma zona. Esses achados confirmam o que já foi discutido na parte correspondente à basofilia metacromática, ou seja, presença de mucopolissacarídeos ácidos nesta estrutura, mesmo em se tratando de área já afetada.

Ao que parece, a despolimerização de mucopolissacarídeos ácidos na dentina pericanalicular é mais lenta que na dentina intercanalicular. Isso pode ser devido à maior resistência desta zona às alterações decorrentes do processo cariioso, e também ao seu maior conteúdo de mucopolissacarídeos ácidos, em relação à dentina intercanalicular.

Da análise geral dos resultados do Azul de Alcian pH 2,5, confirmou-se a diminuição de mucopolissacarídeos ácidos na região superficial da zona 2, ao contrário do que aconteceu na região profunda dessa mesma zona onde houve aumento da reação positiva.

Na zona 3 houve apenas positividade na dentina pericanalicular, confirmando resultados anteriores.

#### c) Reações do Azul de Alcian pH 1

Diversos trabalhos de investigação sobre identificação de mucopolissacarídeos ácidos sugerem que o abaixamento do pH da solução do corante básico para valores próximos ao pK do grupo sulfato, torna essa solução corante seletiva para esse grupo (SPICER, 1960; JOHNSON e col., 1962).

Com base nesses resultados, LEV e SPICER (1964) comprovaram que estruturas contendo grupos sulfato coravam-se, especificamente, pelo Azul de Alcian a pH 1.

Nestas condições, empregou-se na presente pesquisa o Azul de Alcian pH 1, procurando-se corar seletivamente os radicais sulfato.

Confrontando-se os resultados obtidos com o Azul de Alcian pH 1 com os obtidos através da Basofilia metacromática com Azul de Toluidina (Quadro IV), observa-se que o Azul de Alcian pH 1 corresponde, mais ou menos, ao Azul de Toluidina empregado -

a pH 3. As diferenças observadas, principalmente no que tange à reação mais acentuada do Azul de Alcian, devem ser levadas em conta da maior especificidade do Azul de Alcian pH 1 aos grupos sulfato.

A camada externa da zona 1 não exibiu reação ao Azul de Alcian pH 1, o que confirma a inexistência de mucopolissacarídeos ácidos sulfatados nessa área. Em contraposição, a camada interna apresentou forte reação, contendo, pois, grande quantidade de radicais sulfato em condições detectáveis. Isto comprova mais uma vez a maior especificidade do Azul de Alcian pH 1 sobre o Azul de Toluidina, para identificação de grupos sulfato.

Na região superficial da zona 2, o conteúdo canalicular exibiu reação moderada, comprovando a presença de mucopolissacarídeos sulfatados. A dentina pericanalicular, bastante alterada, produziu reação fraca, enquanto a julgar pelos resultados, não existem mucopolissacarídeos ácidos contendo grupos sulfato, (provavelmente já despolimerizados, ou inexistentes) na dentina intercanalicular. A região profunda da zona 2 exibiu grande quantidade de mucopolissacarídeos ácidos sulfatados no interior dos canálculos confirmando resultados anteriores. A dentina pericanalicular, apresentou grande quantidade de mucopolissacarídeos ácidos sulfatados, demonstrando ao que tudo indica, sofrer um princípio de despolimerização.

Quanto à dentina intercanalicular da região profunda da zona 2, tem-se a dizer que ela não reagiu aos testes com o Azul de Alcian pH 1. Como nos métodos anteriores essa zona reagiu mais intensamente que a própria dentina intercanalicular normal, parece lícito supor que a forte reação metacromática aí verificada anteriormente, era devida a radicais carboxílicos. Isso é confirmado pela ausência de positividade à metacromasia em pH 3 ou inferiores, e ainda, ausência de reação ao Azul de Alcian pH 1.

A dentina esclerosada mostrou a presença de pequena quantidade de radicais sulfato localizada na região pericanalicular, confirmando os resultados anteriores.

#### d) Fluorescência pela Corifosfina

São poucos os trabalhos realizados por meio de microscopia de fluorescência, em relação à dentina cariada. BENEDICT -

(1929) e ARMSTRONG (1963 a e 1963 b) realizaram pesquisas nesse sentido; entretanto, êsses autôres limitaram-se a investigar a fluorescência natural da dentina cariada. As suas conclusões sugerem que a dentina cariada tem a sua fluorescência natural bastante diminuída.

Em 1966, VIZIOLI e VIDAL desenvolveram um método para detecção de mucopolissacarídeos ácidos, usando a Corifosfina, um corante acridínico. Como êsse método demonstrou ser altamente sensível, foi aplicado nesta pesquisa, com o propósito de se confirmar e complementar os resultados obtidos com os demais métodos para mucopolissacarídeos ácidos.

As estruturas contendo mucopolissacarídeos ácidos, exibem, após a fluorocromização, uma fluorescência alaranjada, que decresce em intensidade em relação direta com o pH da solução corante. Os resultados obtidos confirmaram integralmente aqueles obtidos com Azul de Toluidina.

Entretanto, foi notado um detalhe interessante, não relacionado com mucopolissacarídeos ácidos, mas sim com a fluorescência da dentina intercanalicular. As estruturas contendo colágeno, quando fluorocromizadas com corantes acridínicos, exibem fluorescência verde intensa, como relatado por VIZIOLI e FERNANDES (1965). Isto revelou-se válido para a dentina intercanalicular normal, que exibiu forte fluorescência verde. Nas zonas cariadas, especialmente na área correspondente à região superficial da zona 2, houve uma queda de intensidade de fluorescência, que se tornou verde pardacenta e sem brilho. Essa diminuição da fluorescência é significativa, podendo indicar alterações nos componentes orgânicos da matriz dentinária. Aliás, um fenômeno semelhante foi relatado por VIDAL (1964 b), que detectou perda de fluorescência nas zonas de desinserção de tendões de cobaia desinseridos, usando outro fluorocromo, o amarelo de tiazol.

#### e) Tratamento pela Hialuronidase Testicular

Segundo LISON (1960 a), a hialuronidase testicular tem ação não somente sobre o ácido hialurônico, mas também sobre o ácido condroitinsulfúrico (tipos A e C) e ainda sobre o queratosulfato.

Os resultados obtidos por êste tratamento, espelhados no quadro VII permitiram as seguintes observações:

A camada externa da zona 1 não apresentou metacromasia em condição alguma, o que sugere que as áreas metacromáticas obtidas com cortes-testemunha até pH 3,5 eram devidas a ácido hialurônico, que foi hidrolisado pelo enzimo. Aliás, a falta de reações positivas ao Azul de Alcian pH 1 e ao Azul de Toluidina em pH igual ou inferior a 3 confirmam a ausência de Mucopolissacarídeos ácidos sulfatados nesta área.

A camada interna da zona 1 mostrou áreas metacromáticas resistentes ao tratamento, mesmo ao nível de pH 3, o que demonstra certa quantidade de mucopolissacarídeos ácidos sulfatados, provavelmente do tipo condroitin-sulfúrico B. Isto não exclui a possibilidade de existirem, na camada interna da zona 1 outros polissacarídeos ácidos sulfatados, como ácido condroitin-sulfúrico tipos A e C, não resistentes ao tratamento. Entretanto, a maior quantidade parece ser mesmo representada pelo tipo B, já que a intensidade da metacromasia nesta área, após o tratamento enzimico, foi praticamente a mesma dos cortes-testemunha.

Na região superficial da zona 2, com exceção dos remanescentes da dentina pericanalicular, as demais estruturas dentinárias não demonstraram metacromasia após o tratamento. Em se tratando de uma área em fase de completa despolimerização dos mucopolissacarídeos ácidos, era de se esperar tal resultado. A metacromasia do material interno dos canalículos atingidos pelo processo de cárie desapareceu completamente, o que indica que tal reação era conferida por ácido hialurônico e/ou ácido condroitin-sulfúrico, tipos A, C ou ambos. A presença deste último tipo (condroitin-sulfúrico) em suas variedades A e C parece confirmada pelas reações positivas obtidas com Azul de Toluidina em pH igual ou inferior a 3 e Azul de Alcian pH 1. Ao mesmo tempo, isto sugere que não há presença detectável de condroitinsulfato do tipo B nesta região intracanalicular, devido à falta de positividade à metacromasia após o tratamento pela hialuronidase testicular.

A dentina pericanalicular, nesta região superficial, demonstrou possuir pequena quantidade de ácido condroitin-sulfúrico tipo B, observação esta ratificada pela fraca positividade após o tratamento enzimico. LONGHI e SASSO (1965) detectaram o ácido condroitin-sulfúrico tipo B nesta região da dentina normal. Esta constatação foi confirmada pelos resultados desta pesquisa.

A dentina intercanalicular não apresentou, na região superficial da zona 2, nenhuma metacromasia, o que comprova resulta

dos obtidos anteriormente, sobre a completa despolimerização de mucopolissacarídeos ácidos nesta área.

Na região profunda da zona 2, o conteúdo canalicular conservou metacromasia até pH 3, sugerindo a presença de condroitinsulfato tipo B. Como não houve reação positiva à metacromasia no interior dos canálculos da região superficial, o condroitinsulfato B ali presente deve ter sido despolimerizado anteriormente. Dessa maneira, parece comprovado que o material intracanalicular contém, além de ácido hialurônico, os três tipos de condroitinsulfato. A quantidade de condroitinsulfato B parece ser pequena no material intracanalicular, sendo provavelmente rapidamente despolimerizada na região superficial. Na região profunda, como se supõe que a despolimerização ainda não se completou, este tipo de mucopolissacarídeo ácido ainda é detectável.

As observações realizadas na zona 3 apenas confirmaram a presença de condroitinsulfato B na dentina pericanalicular. A metacromasia verificada na área intercanalicular desta zona era, provavelmente, devida a ácido hialurônico em pequena quantidade. As demais estruturas não demonstraram metacromasia, em concordância com os resultados já obtidos.

Finalmente, resta assinalar, para confirmação geral, que o ácido condroitin-sulfúrico foi isolado por HESS e LEE (1952), - que demonstraram assim a sua presença na dentina normal.

#### f) Reações de bloqueio

##### 1) Metilação:

A metilação, provocando a esterificação dos grupos carboxílicos, torna-os não ionizáveis; conseqüentemente, são abolidas as reações de metacromasia devidas a mucopolissacarídeos ácidos que contém êsses grupos, quando corados pelo Azul de Toluidina (FISHER e LILLIE, 1954). Os mesmos autores observaram ainda - que a metilação suprimia também a metacromasia devida a grupos sulfatados, através de uma dessulfatação.

A metilação efetuada sobre os cortes de dentina cariada e normal, na presente pesquisa, aboliu completamente a metacromasia das estruturas.

##### 2) Metilação seguida de Saponificação:

A saponificação pela potassa alcoólica, efetuada após a metilação, restabelece os grupos carboxílicos primitivos e restau

ra as reações de metacromasia das estruturas que contém tais grupos. Entretanto, a saponificação não tem ação sobre os grupos sulfatados (LILLIE, 1958; SPICER e LILLIE, 1959).

Os resultados do presente trabalho apontaram o retorno da metacromasia até o nível do pH 3,5. Essa metacromasia foi pouco menos intensa em determinadas áreas (como a dentina pericanalicular), em relação à metacromasia apresentada pelos cortes-testemunha. Essa ligeira diminuição da metacromasia pode ser atribuída aos mucopolissacarídeos ácidos sulfatados, que sofrendo dessulfatação, não mais têm condições de apresentar reação positiva.

A pH 3 ou inferiores, todas as estruturas não mais apresentaram metacromasia. Isso vem confirmar que a metacromasia apresentada pelas estruturas a pH 3 e inferiores era devida a mucopolissacarídeos ácidos contendo radicais sulfatados.

### 5.2.2 - Métodos para Polissacarídeos neutros

#### a) Método do Ácido Periódico-Schiff (PAS)

A reação do ácido periódico-Schiff é frequentemente considerada como indicativa de radicais vic-glicol (-CHOH-CHOH), e portanto sugerindo a presença específica de um polissacarídeo, ainda que, conforme adverte LISON (1960 b), isso somente seja verdadeiro em estruturas onde a presença de glúcídeos tenha sido anteriormente comprovada.

Entretanto, deve-se levar em consideração que também as glicoproteínas e as mucoproteínas dão reações positivas ao PAS.

A zona I mostrou forte reação positiva, sem distinção de camadas. É muito difícil precisar se essa positividade deve-se somente a polissacarídeos neutros, como se poderia pensar de início. Esta zona está em contacto íntimo com o meio exterior, sendo local de inúmeras reações bioquímicas oriundas de atividade bacterianas.

MARTENS e col. (1959) relataram que as propriedades corantes da dentina pelo PAS dão uma idéia do grau de polimerização do tecido. Sugerem que como resultado da cárie, os agregados proteína-carboidratos da dentina são despolimerizados, e grupos mais reativos se tornam evidentes, produzindo forte positividade ao PAS. É fora de dúvida que a zona I é uma região de completa desa-

gregação do complexo proteína-carboidrato. De acôrdo com MARTENS e col., seria uma região propícia para apresentar forte positividade ao PAS, como de fato ocorre. Entretanto também é válida a hipótese de que as glicoproteínas existentes na zona 1 sejam responsáveis, pelo menos em parte, por essa reação positiva.

Na região superficial da zona 2, o conteúdo canalicular exibiu intensa positividade ao PAS, o que confirma as observações de SOGNAES e WISLOCKI (1950) e MACHA e col. (1966). É provável - que o material interno dos canálculos distendidos possua grande quantidade de polissacarídeos neutros. No entanto, como existe - nessa área grande concentração bacteriana, não se pode afastar a hipótese de que uma parte considerável da reação PAS-positiva seja devida aos corpos bacterianos e/ou seus produtos metabólicos.

SOGNAES e WISLOCKI (1950) relataram que a dentina intercanalicular não é corada pelo PAS, quando atacada pelo processo de cárie. Os resultados da presente pesquisa não são concordes com essa afirmação, uma vez que a dentina intercanalicular cariada corou-se fortemente, a ponto de impedir, em alguns locais, a distinção da dentina pericanalicular. Aliás, esta reação PAS-positiva foi também apontada por MACHA e col. (1966), que deduziram - que isto significaria a preservação de glicoproteínas no local. Os autores acima fizeram tal afirmação em virtude de a dentina intercanalicular permanecer inalterada após o tratamento pela amilase salivar. Entretanto isso apenas prova que essa positividade, provavelmente, não é devida a glicogênio, mas pode muito bem ser devida, pelo menos em parte, a outros tipos de polissacarídeos neutros. Desta maneira, parece mais acertado atribuir a positividade da dentina intercanalicular, na região superficial da zona 2, a polissacarídeos neutros, tornados evidentes pelo processo de desagregação estrutural e, também às glicoproteínas existentes na matriz orgânica da dentina. Como a dentina é rica em feixes de colágeno, que são PAS-positivos, é de se esperar tal reatividade por parte da dentina.

A dentina pericanalicular mostrou positividade ao PAS, na região superficial da zona 2. Evidenciaram-se assim as alterações decorrentes do processo de cárie, que provocaram liberação - de grupos PAS-positivos. Isto é bastante significativo, recordando-se que a dentina pericanalicular normal é pouco PAS-positiva.

Na região profunda da zona 2, o aspecto do material in-

tracanalicular foi semelhante ao observado na região superficial, embora em menor quantidade. A dentina intercanalicular exibiu moderada positividade, o que, segundo MARTENS e col. (1959) indica grau de polimerização maior que aquêlê observado na região superficial e, acrescenta-se, maior grau de união com outros polímeros biológicos. A dentina pericanalicular prosseguiu exibindo reação PAS-positiva, embora fracamente, demonstrando um grau menos adiantado de modificações, em relação à zona anterior.

A zona 3 mostrou moderada reação positiva da dentina intercanalicular, semelhantes à dentina normal, sugerindo não haver alterações nos mucopolissacarídeos neutros e glicoproteínas nessa região, o que concorda com os achados de MACHA e col. (1966). O conteúdo canalicular não apresentou reação alguma, não sendo evidenciados os prolongamentos odontoblásticos. Isso confirma que os canalículos da zona 3 são obstruídos por um material PAS-negativo. A dentina pericanalicular não exibiu positividade, o que pode confirmar a integridade dessa estrutura pela ausência de despolimerização de seus componentes.

b) Ácido Periódico-Schiff após tratamento pela Amilase salivar

Os resultados não apresentaram diferença alguma, em relação àqueles obtidos pelo PAS sem tratamento prévio, o que indica que as reações PAS-positivas observadas não são devidas ao glicogênio. Tal fato corrobora os achados de SOGNAES e WISLOCKI (1950) e MACHA e col. (1966).

### 5.2.3 - Métodos para Grupos Protéicos

a) Acidofilia Total pelo método do Orange G

O termo "acidofilia total" foi proposto por LISON (1960 e) para designar a determinação do número total de radicais básicos de uma proteína. Se uma proteína é colocada em uma solução muito ácida, de pH marcadamente inferior ao pK dos radicais carboxílicos, ela apresentará:

- 1) todos os radicais ácidos (carboxilas) não ionizados;
- 2) todos os radicais básicos (amino + guanidil + imidazol) ionizados.

Segundo LISON, nestas condições expostas acima, a proteína fixa anions, sendo que a capacidade total de fixação desses anions depende unicamente do número total de grupos básicos ionizados, e não depende da natureza dos anions. Logo, em solução muito ácida, a capacidade de coloração pelos corantes ácidos depende somente da quantidade de grupos básicos.

Ainda segundo LISON, a determinação da acidofilia total pode ser realizada pelo método de DEITCH (1955), onde o corante usado é o amarelo de naftol S, a pH 2,78. Este nível de pH parece demasiado alto, sendo opinião do autor desta pesquisa que o corante ácido usado poderia ter um pH mais baixo. Empregou-se então o Orange G a pH 1,7, numa modificação da técnica original de DEITCH. Aliás, o Orange G já foi empregado na detecção de proteínas da dentina por SOLOMONS (1958), embora a técnica empregada por esse autor tenha sido diferente.

A zona 1 demonstrou conter grande quantidade de radicais básicos detectáveis, o que sugere a presença predominante de proteína no local. Isto concorda com os achados de ARMSTRONG (1958), segundo os quais a matriz orgânica da dentina normal é literalmente desintegrada pela colagenase, tornando livres grupos epsilon-amino e guanidílicos. Estas observações são reforçadas pelos trabalhos de LITTLE (1959), ARMSTRONG (1959) e OPDYKE (1960), que enfatizam a positividade apresentada pela dentina cariada aos testes para proteínas e sustentam que o conteúdo orgânico da dentina é a última fração do tecido a ser destruída. Devido à intensa positividade apresentada pela zona 1, pode-se sugerir que esta zona é formada, quase integralmente, de matéria orgânica (mais especificamente, colágeno), cujo estado de organização será discutido quando se tratar dos resultados fornecidos pela birrefringência.

Na região superficial da zona 2, o conteúdo canalicular mostrou ser possuidor de grande quantidade de radicais básicos detectáveis, sugerindo a presença de proteínas no local. Também foram notadas granulações positivas ao Orange G, em tudo semelhantes às aquelas observadas nos exames de basofilia. Estas granulações mostram possuir fração protéica.

A dentina pericanalicular, desagregada, não contém grande quantidade de proteína. Ao contrário, a dentina intercanalicular, pela sua reação fortemente positiva, parece conter grande fração protéica. Como essa zona está submetida a extensa desmine-

realização, essa afirmação parece ser procedente.

Na região profunda da zona 2, as reações das estruturas foram moderadas; isto indica que a quantidade de proteínas em condições detectáveis é menor neste local, o que provavelmente se deve à menor desagregação da área e, conseqüentemente, uma presença menor de radicais básicos em condições de reagir.

A zona 3, da dentina esclerosada, apresentou reações semelhantes à dentina normal, tanto na área intercanalicular como na pericanalicular, sugerindo não haver modificações, pelo menos que fôssem sensíveis a este método. MACHA e col. (1966) relataram que na zona pericanalicular da dentina esclerosada existem modificações do colágeno, chegando o mesmo a desaparecer. Estas conclusões foram baseadas em estudos de birrefringência passíveis de reparação. Como os testes topoquímicos (em resultados obtidos pelo Orange G) foram contrários a essa afirmação, discutir-se-á esse assunto quando se tratar da birrefringência. O conteúdo canalicular da zona esclerosada não demonstrou reação positiva ao Orange G, o que parece sugerir que não existem proteínas no local.

#### b) Determinação do ponto isoelétrico aparente

Segundo LISON (1960), o ponto isoelétrico de uma proteína seria o pH onde o número de cargas positivas fôsse igualado pelo número de cargas negativas contidas nessa proteína. Nesse momento, a proteína, colocada em um campo elétrico, não migraria - nem em direção ao cátódio, nem em direção ao ânódio. A determinação correta do ponto isoelétrico é conseguida através da eletroforese.

O ponto isoelétrico aparente - "point isoéletrique prétendu" - representa o ponto onde se cruzam as curvas produzidas - por dois corantes (um ácido e um básico) utilizados em soluções - de diferentes pH, desde 2,2 a 7,8 em intervalos iguais (método de PISCHINGER, 1926). Segundo LISON este ponto isoelétrico aparente, não deve ser confundido com aquele determinado pela eletroforese, mas isso não impede que as curvas obtidas em função do pH sejam documentos de valor no estudo das proteínas e das suas propriedades eletropolares.

Não se encontrou, nas pesquisas bibliográficas realizadas para este trabalho, qualquer menção sobre a determinação do

ponto isoelétrico da dentina cariada. Em vista disso, as pesquisas foram orientadas no sentido de se determinar o ponto isoelétrico aparente das dentinas cariadas e normal, obtendo-se uma base para comparação.

Pelos resultados obtidos através das curvas de pH, ficou demonstrado que o ponto isoelétrico aparente da dentina cariada (4,7) é inferior ao da dentina normal (5,1), o que indica muito provavelmente, que o processo de cárie provoca alterações na estrutura da proteína dentinária. Não está afastada a hipótese de que o abaixamento do ponto isoelétrico aparente da região cariada signifique somente alterações proteicas, mas também alterações nos carboidratos e outras substâncias presentes na dentina, pois não se deve esquecer que todos esses elementos formam um verdadeiro complexo interdependente. De qualquer maneira, este é mais um dado que fala a favor da desagregação estrutural que ocorre durante o processo cariioso. Tal fenômeno certamente libera radicais ácidos dos mucopolissacarídeos ácidos e mesmo das proteínas, o que pode explicar a maior reatividade da dentina cariada.

#### c) Reação da Ninhidrina-Schiff para grupo Amino

A reação da Ninhidrina-Schiff foi proposta por YASUMA e ICHIKAWA (1953) para evidenciação do grupo amino, LISON (1960 f) considera este método um processo seguro e sensível para demonstração do radical  $R-CH_2-NH_2$ . Os resultados obtidos através desta reação permitem as seguintes observações para a dentina cariada:

As reações observadas na zona 1 demonstraram grupos amino detectáveis, principalmente na região convencionada como camada interna, onde a reação foi fortemente positiva. Este resultado está de acordo com ARMSTRONG (1958), que afirma que a matriz orgânica da dentina é literalmente desintegrada pela colagenase, havendo liberação de grupos epsilon-amino, entre outros.

Na zona 2, a região superficial apresentou fraca reação positiva no interior dos canalículos aumentados, confirmando a presença de uma pequena quantidade de radicais amino no material intercanalicular. A dentina pericanalicular não mostrou reação positiva, de onde se deduz que esta estrutura não contém radicais amino, ou então tais radicais não se encontram em condições detectáveis. A dentina intercanalicular mostrou conter, nesta zona, uma quantidade moderada de radicais amino superior àquela demonstrada pela dentina normal. Isso demonstra que a positividade dessa área pode ser devida a um aumento das condições de detecção dos grupos amino.

nao que provavelmente se deve às alterações que ocorrem na dentina intercanalicular.

A região profunda da zona 2 apresentou fraca positividade de à reação, no material intracanalicular e na dentina intercanalicular, confirmando a menor desorganização dessa zona, que possui poucos radicais amino em estado livre.

A zona 3 mostrou apenas fraca reação da dentina intercanalicular, aliás semelhante à da dentina normal, o que confirma o estado relativamente íntegro dessa área.

#### d) Reação de Sakaguchi para grupo guanidil

Os resultados indicaram fraca reação positiva na zona 1. ARMSTRONG (1958) afirmou que na dentina cariada existe liberação de radicais guanidílicos, entre outros. Como a reação foi negativa nas demais zonas de cárie e na dentina esclerosada, parece que os radicais guanidílicos somente são liberados nas zonas completamente desorganizadas, como a zona 1.

#### e) Desaminação

Conforme era de se esperar, a desaminação provocou sensível queda na intensidade de coloração pelo Orange G, nos locais atingidos pela cárie. Parece válido supor, em vista disso, que a intensa reação positiva observada nas zonas de cárie era, em sua quase totalidade, devida a radicais básicos presentes nesses locais, liberados em virtude das alterações ocorridas nas proteínas da matriz dentinária. Parece então que o Orange G é mais sensível para demonstração de grupos -  $\text{NH}_3^+$ .

#### 5.2.4 - Método para Lipídeos

Esta pesquisa foi orientada no sentido de se detectar a presença de lipídeos em geral na dentina cariada, sem a preocupação de classificá-los.

A zona 1 exibiu sudanofilia intensa, sem distinção de camada, comprovando possuir lipídeos em grande quantidade, o que confirma os achados de SOGNAES e WISLOCKI (1950). A procedência do material sudanófilo é atribuída por êstes autôres à presença de bactérias no local, uma vez que segundo os seus resultados, a

coloração somente se manifestava em locais invadidos pelos microorganismos. Esta afirmação parece procedente, uma vez que a quantidade de lipídeos observada nesta zona, na presente pesquisa foi demais vultosa para ser devida apenas ao conteúdo lipídico da dentina. Em apóio a esta hipótese, BODECKER (1931) relatou que a dentina normal contém apenas 0,4% de lipídeos totais, e mais recentemente HESS (1956) fixou essa percentagem em 0,36%. MILLER (1963) afirmou que os corantes para gordura por êle utilizadas localizaram-se na camada necrótica (correspondente à zona 1), e na parte superior da camada destrutiva (correspondente à região superficial da zona 2), sendo êsses os locais de infiltração bacteriana mais intensa.

Na região superficial da zona 2, os canaliculos intumescidos mostraram-se obliterados por um material fortemente sudanófilo, comprovando as afirmações de SOGNAES e WISLOCKI (1950) e MILLER (1963). Entretanto, além desse material amorfo, foi constatada na presente pesquisa a presença de granulações sudanófilas, semelhantes àquelas já descritas nos exames de basofilia metacromática e de grupos protéicos, granulações essas que demonstraram conter lipídeos.

As dentinas pericanalicular e intercanalicular não retiveram o corante nesta região, indicando ausência de lipídeos. Isto concorda com as observações de SOGNAES e WISLOCKI (1950) e ALLRED (1966 a), que também relatam a ausência de coloração da dentina pericanalicular e intercanalicular nos locais mais severamente atingidos pelo processo de cárie. ALLRED (1966 b) sugere que ambas as estruturas possuem componentes lipídicos no estado normal; entretanto elas necessitam prévio desmascaramento para exibir reação positiva. Ainda segundo ALLRED (1966 a), a sudanofilia da dentina pericanalicular decresce à medida que a lesão cáriosa se torna mais severa. Esta afirmação coincide com os resultados do presente trabalho.

Na região profunda da zona 2, o conteúdo canalicular exibiu idêntica reação àquela apresentada na área anterior, sendo que a quantidade do material sudanófilo foi menor. Isso confirma que a presença de bactérias está relacionada com a reação positiva ao Sudan Black, pois nessa área a presença de bactérias é menor que na área anterior. A dentina pericanalicular apresentou fraca reação positiva, o que está de acôrdo com ALLRED (1966 a). A dentina intercanalicular permaneceu não corada.

A zona esclerosada apresentou fraca reação da dentina - pericanalicular, que demonstrou assim conter pequena fração lipídica. A dentina intercanalicular não apresentou reação positiva, o mesmo acontecendo com o conteúdo canalicular. Este conteúdo, ao que tudo indica, parece não conter lipídios.

### 5.3 - ULTRAESTRUTURA

#### 5.3.1 - Dicroísmo

As bases fundamentais do fenômeno do dicroísmo foram explanadas por VIDAL (1963, 1964 c) em um trabalho onde o autor afirma que o dicroísmo apresentado por cortes corados pelo Azul de Toluidina traduz a ordenação molecular dos mucopolissacarídeos ácidos. Um breve resumo destas observações será exposto a seguir, a fim de proporcionar melhor compreensão do fenômeno e base para - discussão.

"Os radicais =NH dos grupos quinonodiminicos estão ligados às moléculas de mucopolissacarídeos ácidos nos radicais aniônicos, de tal sorte que a posição dos eletrons ressonantes das moléculas de corante observem um "quantum" de luz, saltando para níveis superiores de energia. Nesta posição, os feixes de colágeno são perpendiculares ao plano de polarização da luz (PPL). As moléculas de mucopolissacarídeos ácidos são então paralelas às moléculas de colágeno, tendo as moléculas do corante posição perpendicular ao substrato de mucopolissacarídeos às quais estão ligadas. Os feixes de colágeno, nestas condições, aparecem dicroicos. Ora, o dicroísmo é um fenômeno devido à absorção seletiva da luz polarizada pelos eletrons ressonantes das moléculas do corante, o qual, por sua vez, se prende de maneira orientada às moléculas do ~~substrato~~ quais são os mucopolissacarídeos ácidos".

Partindo-se do acima exposto, procurou-se detectar o dicroísmo da dentina normal, a fim de se comprovar o estado de ordenação molecular dos mucopolissacarídeos ácidos. Cumpre salientar que o fenômeno do dicroísmo é difícil de ser observado na dentina, em virtude da complexidade desta estrutura. A dentina intercanalicular normal apresentou dicroísmo, o que demonstra que na dentina íntegra, os mucopolissacarídeos ácidos possuem orientação molecular.

Nas regiões atingidas pela cárie, o dicroísmo não foi observado, comprovando-se dessa maneira que a ordenação molecular

dos mucopolissacarídeos ácidos foi desfeita.

Finalmente, resta uma observação sobre a ausência de dicroísmo apresentada pela dentina pericanalicular normal. À primeira vista, poderia parecer que esta estrutura não possui ordenação molecular dos mucopolissacarídeos ácidos, podendo, portanto, ser posto em dúvida o dicroísmo da dentina intercanalicular, desde que se trata do mesmo complexo tecidual. É pensamento do autor da presente pesquisa que o dicroísmo não é detectado na dentina pericanalicular em virtude da configuração estrutural dessa zona, que é constituída de fibrilas colágenas de trajeto espiralado ou helicoidal, conforme relatado por SHROFF e col. (1956), OSSWALD (1963) e VIDAL (1964). É evidente que esta estruturação torna impossível a detecção do dicroísmo.

### 5.3.2 - Birrefringência

#### a) Birrefringência em dentes descalcificados

Os trabalhos de KRAMER (1951), LENZ (1959), LITTLE (1959), JOHANSEN e PARKS (1962), OSSWALD (1963) e JOHANSEN (1964) relataram a natureza colagenosa da matriz orgânica da dentina. Isto foi confirmado através dos resultados da presente pesquisa.

É fato aceito que a cárie, ao atingir a dentina, promove a descalcificação da matriz inorgânica, efetuando posteriormente a lise da matriz colagenosa. Conforme comprovado pelos exames de acidofilia, a zona I é composta quase exclusivamente de colágeno, remanescente da descalcificação que ali teve lugar.

Segundo VIDAL (1964 c), os feixes de colágeno constituem-se em meio birrefringente, sendo que a birrefringência é resultado, em quase sua totalidade, da orientação das moléculas de proteína. Os feixes de colágeno íntegro são fortemente birrefringentes, e a diminuição dessa birrefringência significa a perda parcial da ordenação molecular.

A zona I, comparativamente à dentina normal, perdeu uma parte da sua birrefringência, o que significa alterações na sua ordenação molecular. A fraca birrefringência notada, mesmo no ponto máximo de extinção, confirma que as fibras de colágeno têm diversas orientações, embora a orientação predominante dos feixes seja paralela à superfície dental. Estas considerações suportam a afirmativa de que o colágeno da zona I guarda ainda certa estruturação molecular.

A região superficial da zona 2 mostrou fraca birrefringência da dentina intercanalicular, predominantemente orientada - em sentido perpendicular aos canalículos. Entretanto, embora haja predominância nesse sentido, os feixes de colágeno formam uma trama fibrosa, havendo fibras em tôdas as direções (BRADFORD, 1958a ; LITTLE, 1959 e JOHANSEN, 1964). Esse arranjo rendilhado diminui a birrefringência da matriz. Somando-se a isso as alterações ocorridas na ordenação das moléculas de proteína, é evidente que a birrefringência se torna fraca.

O conteúdo canalicular nesta zona exibiu fraquíssima birrefringência. Na dentina normal, o conteúdo canalicular possui fraca birrefringência que, muito provavelmente, é conferida por pequenas fibrilas colágenas intimamente associadas com os prolongamentos odontoblásticos, conforme demonstrado por JOHANSEN e PARKS (1962) e OSSWALD (1963). A diminuição da intensidade de birrefringência do material intracanalicular na região superficial da zona 2 deve-se, com bastante probabilidade, às alterações do seu conteúdo.

A dentina pericanalicular também deve na sua birrefringência às fibrilas colágenas de pequenas dimensões existentes em sua matriz. Essas fibrilas foram descritas por YAMAMOTO (1959) e JOHANSEN e PARKS (1962). Pelo mesmo mecanismo de alteração sugerido linhas atrás, também esta estrutura sofre perda parcial de birrefringência.

Na região profunda da zona 2, os fenômenos destrutivos provocados pela cárie são menos severos; a birrefringência das estruturas está mais preservada. Observe-se que a birrefringência da dentina pericanalicular não desaparece mesmo no ponto de extinção da área, fato comprovado anteriormente por KAYE e HEROLD (1966), em dentina normal. Sabe-se, pelos trabalhos de YAMAMOTO (1959), JOHANSEN e PARKS (1962), OSSWALD (1963), KAYE e HEROLD (1966) e VIDAL (1967), que as fibrilas colágenas da matriz pericanalicular possuem trajeto espiralado, contornando o canalículo. Essa singular disposição permite à dentina pericanalicular apresentar birrefringência, qualquer que seja a sua posição em relação ao plano de polarização da luz. Na região profunda da zona 2, esse fenômeno pode ser observado, o que sugere que as alterações estruturais nesse local são de pequena monta, no que se refere ao colágeno. Na dentina intercanalicular, ao contrário, podem ser notadas alterações mais significativas.

As observações levadas a efeito na dentina esclerosada sugerem que, embora esta zona apresente birrefringência mais intensa da dentina intercanalicular, ela também sofre modificações de posição, em seu componente orgânico. Estas alterações são caracterizadas pela maior intensidade de birrefringência que a dentina normal, aliada à distinta disposição de suas fibras colágenas; tal fato evidencia-se pela posição diferente em que foi observada a birrefringência mais intensa, quando comparada à dentina normal. Isso parece comprovar que um estímulo severo pode provocar modificações na orientação das fibras da dentina. GRADY e YAEGER (1965) relataram que a dentina anormal produzida em ratos mostrou uma diferença de orientação das fibras de colágeno, em relação à dentina normal. No caso da dentina esclerosada, poder-se-ia sugerir que os estímulos provocados à distância pelo processo de cárie teriam um papel na deposição de material birrefringente com diferente orientação. Tal fenômeno revelaria a possibilidade de metabolismo de colágeno e MPA na dentina.

A zona pericanalicular da dentina esclerosada exibiu fraca birrefringência, como ocorre na dentina normal; isso parece sugerir que esta estrutura permanece íntegra, pelo menos no que concerne ao seu conteúdo orgânico. MACHA e col. (1966) relataram que na zona pericanalicular da dentina esclerosada existem modificações do colágeno, chegando o mesmo a desaparecer. Essas afirmações foram baseadas no desaparecimento da figura por êles denominada de "cruz de polarização", observada em cortes transversais da dentina normal. No presente trabalho, observou-se que essa figura é devida às fibrilas colágenas de disposição helicoidal que existem na dentina pericanalicular, e também às fibrilas colágenas procedentes da dentina intercanalicular, predominantemente perpendiculares aos canalículos. Tanto é assim que ao girar-se o analisador em cerca de 0,5 graus, as figuras cruciformes desaparecem, em virtude da queda de birrefringência provocada pela diferente posição do analisador. É evidente que não se pode chamar este fenômeno de "cruz de polarização", conforme fizeram MACHA e col. (1966). O verdadeiro exemplo da cruz de polarização é dado pelos cortes de dentes descalcificados não submetidos à desparafinação. Neste caso, a dentina normal cortada transversalmente exibe no interior dos canalículos uma cruz, imagem essa conferida pela parafina que ali penetra. Uma vez desparafinados os cortes, a cruz de polarização desaparece.

A falta de birrefringência apresentada pelo interior dos canálculos da dentina esclerosada parece comprovar que o material ali existente não possui material orgânico com ordenação molecular ou o possui em quantidade ínfima, insuficiente para provocar a visibilidade de qualquer birrefringência. Além disso, em se tratando de dentes descalcificados, é bem provável que o conteúdo canalicular da zona esclerosada (material inorgânico) se tenha perdido em sua quase totalidade.

#### b) Birrefringência em dentes desgastados

A birrefringência observada em dentes desgastados tem uma intensidade maior que aquela apresentada pelos dentes descalcificados. CAPE e KITCHIN (1930) relataram que a substância inorgânica tem efeito compensatório na birrefringência geral da dentina, e que a dentina descalcificada é mais luminosamente birrefringente. Embora esta afirmação seja verdadeira e comprovada, a birrefringência dos dentes desgastados observada na presente pesquisa foi mais luminosa. É bastante provável que êsse aumento de brilho seja devido à maior espessura dos cortes por desgaste, o que provoca maior retardo ótico.

Os exames realizados por êste método confirmaram os comentários feitos para os dentes descalcificados.

#### c) Birrefringência em dentes descalcificados, com compensador de gesso vermelho de primeira ordem

Conforme exposto através dos resultados, os dentes descalcificados não produziram bons resultados, quando examinados com o compensador de gesso vermelho de primeira ordem. Em virtude disso, a discussão será baseada nos resultados obtidos através dos dentes desgastados.

#### d) Birrefringência em dentes desgastados, com compensador de gesso vermelho de primeira ordem

Êstes exames comprovaram que a dentina é, em seu todo, uma estrutura birrefringente positiva, o que foi evidenciado pela tonalidade azul de segunda ordem, na direção de lenta propagação

do feixe luminoso. A dentina pericanalicular é também birrefringente positiva. As zonas amarelas de primeira ordem, observadas - nesta estrutura representam regiões onde a orientação dos feixes de colágeno é contrária. Isto confirma os achados de KAYE e HEROLD (1966).

Na zona 1, os resultados confirmaram os comentários feitos para os dentes descalcificados. A matriz orgânica descalcificada é predominantemente birrefringente positiva; as zonas amarelas de primeira ordem observadas nessa zona são áreas onde a orientação das fibras é contrária.

Na região superficial da zona 2, a birrefringência azul de segunda ordem da dentina intercanalicular é fraca, em consequência do processo de cárie. O mesmo sucede com a dentina pericanalicular. Os pontos brilhantes notados no interior dos canalículos representam, muito provavelmente, cristais existentes no local, conforme sugerido por KEIL (1955), BANEZ e JOHANSEN (1964) e JOHANSEN (1964). Esses cristais podem ser originários de mineralização secundária ocorrida nas zonas de cárie, conforme sugerem TAKUMA e KURAHASHI (1962) e SARNAT e MASSLER (1965).

Os mesmos comentários são válidos para a região profunda da zona 2, onde a desorganização das estruturas é menor, principalmente a dentina pericanalicular, que se apresentou bastante preservada.

Resta discutir a aparência da dentina esclerosada que mostrou-se amarela de primeira ordem, quando examinada na direção de lenta propagação do feixe luminoso, ao contrário, portanto, das demais zonas da dentina. Os resultados indicaram que a dentina esclerosada sofre um aumento na deposição de substância orgânica, e que essa deposição se efetua em orientação diferente do normal. - Esse parece ser o motivo pelo qual a tonalidade da dentina esclerosada é amarela de primeira ordem quando tôdas as outras zonas se apresentam azuis de segunda ordem. A dentina pericanalicular parece totalmente preservada, exibindo sua tonalidade intercalada, conforme já comentado. O conteúdo canalicular da zona esclerosada exibiu-se escuro, sem tonalidade definida. É sustentado por grande número de autôres (BERNICK e col. 1954; KEIL, 1955; KRONFELD, 1955 a; JOHANSEN, 1962; BANEZ e JOHANSEN, 1964; FRANK e col., 1954, HARCOURT, 1964) que os canalículos da dentina esclerosada são obliterados por substância inorgânica. Enquanto os autôres acima citados concordam em que a obliteração dos canalículos se

faz por meio de grandes cristais ali depositados, BRADFORD (1958 b) e VAN HUYSEN (1960) afirmam que a esclerose parece ser uma extensão da calcificação pericanalicular normal no interior dos canalículos. Como o interior dos canalículos da dentina esclerosada não apresentou birrefringência definida, na presente pesquisa, é bem provável que essa calcificação seja insuficiente, contendo pouco material. Aliás, BRADFORD (1958 b) cita que o material obliterante é aparentemente hipocalcificado, o que poderia provocar a falta de maior definição da birrefringência desse material.

#### 5.4 - COLORAÇÃO BACTERIOLÓGICA

Conforme se depreende da análise dos resultados, a grande maioria das bactérias se localizou nas regiões superficiais da dentina cariada. A presença de grandes aglomerados de bactérias na superfície da zona 1, assim como no interior dos canalículos da zona 2 confirmaram os achados de SOGNAES e WISLOCKI (1950), SCOTT e ALBRIGHT (1954), BERNICK e col. (1954) e SARNAT e MASSLER (1965).

JOLLY e SULLIVAN (1960) afirmaram que o número de bactérias por êles encontrado no interior dos canalículos da dentina cariada não era grande o suficiente para que se pudesse encará-lo como fator primordial na produção da lesão. Os resultados da presente pesquisa não suportam essa afirmação. Como não é objetivo deste trabalho discutir o papel das bactérias na produção da cárie, fica apenas a observação.

Tornou-se patente que a partir da superfície, as regiões cariadas contém menor número de microorganismos, até que na zona esclerosada, não mais existem bactérias. A penetração se produz em forma de cunha, cujo vértice se volta para a polpa.

As ramificações laterais dos canalículos, principalmente na região superficial da zona 2, apresentaram-se totalmente obliteradas por corpos bacterianos. A propósito dessa constatação, resalte-se que tôdas as áreas invadidas pelas bactérias produziram reações PAS-positivas; deve-se recordar inclusive que de todos os exames realizados, o PAS e o GRAM destacaram nitidamente as ramificações laterais dos canalículos. Isto pode sugerir que pelo menos uma parte da reação PAS-positiva seja devida à presença de bactérias. De uma maneira geral, é evidente que os locais de infiltração bacteriana foram as zonas que exibiram maiores alterações morfológicas e estruturais.

KRONFELD (1955 a) afirmou que o primeiro estágio da cárie de dentina era a invasão canalicular pelas bactérias. Essa afirmação não parece coincidir com os resultados obtidos no presente trabalho. Se isso fôsse correto, é de se deduzir que a evolução do processo de cárie seria muito mais rápido do que na realidade é, pois as bactérias aprofundar-se-iam rapidamente pelos canálculos. Segundo STONES (1962), a dentina geralmente sofre esclerose antes mesmo de ser invadida pelas bactérias. O autor desta pesquisa, realizando observações em dentes portadores de cárie incipiente, durante a seleção do material para o trabalho, comprovou as afirmações de STONES. Assim sendo, tudo indica que se faz necessária a prévia descalcificação da luz esclerosada dos canálculos, para que se possa efetuar a infiltração bacteriana.

#### 5.5 - DENTINA REPARATIVA

De acôrdo com o exposto no início do capítulo, os resultados obtidos através dos exames efetuados na dentina reparativa, serão a seguir discutidos.

##### 5.5.1 - Estudos Morfológicos

###### a) Dentes descalcificados corados pelo Tricrômico de Mallory

Foi comprovado, através destes exames, que a dentina reparativa difere da dentina primária normal em vários aspectos, de sobejo reconhecidos, quais sejam, menor número de canálculos, trajet<sup>o</sup> irregular dos mesmos, e calibre extremamente fino.

A matriz intercanalicular corou-se inteiramente em azul. Como a coloração de Mallory é específica para colágeno, é de se esperar que, nesta estrutura, a maior porção seja representada pela substância orgânica, havendo portanto um nível de calcificação mais baixo que a dentina primária normal. Estes resultados estão de acôrdo com os achados de SASSO e col. (1966).

###### b) Dentes descalcificados e desgastados examinados em contraste de fase.

Ficou constatado que a dentina reparativa possui um ín-

dice de refração aproximadamente igual para todos os seus componentes, ou seja, ao redor de 1,5050 para os dentes descalcificados e por volta de 1,6541 para os dentes desgastados. É razoável supor que o valor exato esteja entre êsses dois valôres. Ressalte-se ainda que os resultados são bastante semelhantes àqueles obtidos para a dentina normal, donde se conclui que se diferença houver entre os índices de refração da dentina primária e da dentina reparativa, essa diferença não pode ser medida através da microscopia de fase, necessitando métodos mais sensíveis, como a interferometria.

c) Dentes descalcificados e desgastados examinados em campo escuro

Êstes exames demonstraram com segurança que a dentina de reparação possui grande quantidade de matéria orgânica, representada pelos feixes de colágeno, cuja direção predominante é perpendicular aos canalículos. A presença de colágeno é tão grande que dificulta a visibilidade dos canalículos.

5.5.2 - Topoquímica

a) Métodos para Mucopolissacarídeos ácidos  
Basofilia metacromática com Azul de Toluidina:

A análise dos resultados dos quadros III e IV demonstrou que a presença de mucopolissacarídeos ácidos na junção dentina primária - dentina reparativa é grande, principalmente os mucopolissacarídeos ácidos carboxílicos. A pH 3 foi notada fraca metacromasia, que desapareceu abaixo dêsse nível, o que pode indicar pequena quantidade de MPA sulfatados.

As reações metacromáticas da dentina reparativa pouco diferiram da dentina normal. A área intercanalicular da dentina reparativa possui fraca metacromasia, que desaparece a pH 3, o que está de acôrdo com SASSO e col. (1966). Poder-se-ia portanto, deduzir que:

a) a quantidade de MPA presentes na área intercanalicular da dentina reparativa é muito pequena, ou

b) os MPA presentes nessa área não estão em condições -

de reagir com o corante, em virtude de suas ligações com o material orgânico, abundante na região.

A dentina pericanalicular, fortemente metacromática a pH alto, prosseguiu exibindo metacromasia mesmo a pH 1,7. Isto sugere que a área pericanalicular possui forte concentração de MPA inclusive os sulfatados. Este ponto será novamente abordado quando se discutir os métodos de diferenciação de MPA. SASSO e col. (1966) não encontraram metacromasia abaixo de pH 3,3 nas zonas pericanaliculares da dentina reparativa. Este resultado difere frontalmente daquele encontrado na presente pesquisa. Os prolongamentos de Tomes mostraram-se moderadamente metacromáticos, persistindo essa metacromasia fracamente até pH 2,5, o que pode significar presença de MPA carboxílicos e também pequena quantidade de radicais sulfato.

#### Reações do Azul de Alcian pH 2,5

A região da junção dentina primária - dentina reparativa possui mucopolissacarídeos ácidos de ambos os tipos (carboxílicos e sulfatados), o que foi comprovado através da positividade - apresentada ao pH 2,5.

A área intercanalicular mostrou fraca reação positiva, o que está de acordo com os achados de SASSO e col. (1966). A propósito, ressalte-se que estes autores não citam em seu trabalho, o pH da solução de Azul de Alcian utilizado. Da citação bibliográfica, depreende-se que seja o pH 2,5.

A comprovação da presença de MPA carboxílicos e sulfatados na dentina pericanalicular e prolongamentos odontoblásticos é dada pela reação positiva apresentada por essas estruturas.

#### Reações do Azul de Alcian pH 1

A junção dentina primária - dentina reparativa possui - pequena quantidade de Mucopolissacarídeos ácidos sulfatados, que produziram fraca reação positiva ao Azul de Alcian pH 1.

A dentina intercanalicular não possui MPA sulfatados, o que vem confirmar os resultados obtidos através da basofilia metacromática. A dentina pericanalicular e os prolongamentos odontoblásticos reagiram fracamente, comprovando-se o conteúdo de MPA - sulfatados nessas estruturas.

## Fluorescência pela Corifosfina

Este método confirmou as observações feitas para a basofilia metacromática. É digno de nota que a fluorescência verde apresentada pela zona intercanalicular da dentina reparativa é superior à correspondente da dentina normal, o que confirma o maior conteúdo orgânico da dentina reparativa.

## Tratamento pela Hialuronidase Testicular

A junção dentina primária - dentina reparativa apresentou fraca reação positiva após a digestão enzimica. Pode-se concluir que esta reação é conferida por ácido condroitin-sulfúrico do tipo B, resistente à ação da hialuronidase.

A fraca metacromasia apresentada pela zona intercanalicular era, com bastante probabilidade, devida a ácido hialurônico, pois desapareceu completamente após o tratamento enzimico.

A dentina pericanalicular mostrou conter moderada quantidade de ácido condroitin-sulfúrico tipo B, o que está de acordo com os achados de SASSO e col. (1966). Também os prolongamentos odontoblásticos possuem pequena quantidade dessa substância.

## Reações de Bloqueio

A metilação aboliu completamente a metacromasia da dentina reparativa. A metilação seguida de saponificação promoveu o retorno da metacromasia das estruturas até o pH 3,5. A partir do pH 3 não houve reversão, o que comprova que a metacromasia apresentada pelos prolongamentos odontoblásticos e pela dentina pericanalicular, a pH 3 e inferiores, era devida a Mucopolissacarídeos ácidos sulfatados.

### b) Métodos para Polissacarídeos Neutros

#### Método do Ácido Periódico-Schiff (PAS)

A junção dentina primária - dentina reparativa demonstrou possuir polissacarídeos neutros e/ou glicoproteínas, exibindo moderada reação positiva. Levando-se em consideração a afirmativa de MARTENS e col. (1959), pode-se sugerir que a área limítrofe entre as dentinas primária e reparativa seja uma região de po-

limerização mais baixa.

A dentina intercanalicular exibiu fraca positividade, o que está de acôrdo com os resultados de SASSO e col. (1966). A dentina pericanalicular, fracamente positiva, demonstrou possuir pequena quantidade de polissacarídeos neutros e/ou glicoproteínas, o mesmo sucedendo com os pròlongamentos odontoblásticos.

#### Digestão pela Amilase Salivar

A hipótese de que as reações PAS-positivas apresentadas pelas estruturas da dentina reparativa sejam devidas a glicogênio é eliminada pela resistência das zonas positivas ao teste da amilase salivar.

#### c) Métodos para grupos protéicos

##### Acidofilia Total pelo método do Orange G pH 1,7

A junção dentina primária-dentina reparativa mostrou - forte positividade ao Orange G, o que demonstra grande número de radicais básicos em condições detectáveis. Sugere-se, pois, que a presença de proteínas é predominantemente no local.

A área intercanalicular também se apresentou fortemente positiva, superando a reação da dentina normal. Isto concorda com a idéia geralmente aceita da predominância da substância orgânica na dentina reparativa. SASSO e col. (1966) também encontraram - grande fração protéica nessa zona.

Os resultados obtidos pelos exames efetuados na área pericanalicular apontaram grande concentração de proteínas, superior àquela encontrada na mesma região da dentina normal. Isto parece comprovar que a dentina pericanalicular da zona 4 é menos calcificada que a correspondente da dentina normal. Quanto aos prolongamentos odontoblásticos, a sua reação positiva foi semelhante à apresentada pelos prolongamentos da dentina normal, demonstrando conter grande fração protéica.

#### Reação da Ninhidrina-Schiff para grupo amino

A junção dentina primária - dentina reparativa não reagiu, demonstrando não haver grupos amino, pelo menos em condições detectáveis, nessa região.

A dentina reparativa possui pequena quantidade de grupos amino em condições de reagir, localizados na área intercanalicular. Os prolongamentos odontoblásticos estão nas mesmas condições. A dentina pericanalicular não reagiu, demonstrando que os grupos amino, se os houver, não estão em condições de reação. Estes resultados condizem com aqueles encontrados por SASSO e col. (1966).

#### Reação de Sakaguchi para grupo guanidil

A negatividade a esta reação sugere que não existem grupos guanidil em condições de reagir na dentina reparativa. SASSO e col. (1966) encontraram fraca reação positiva indicando a presença de pequena concentração de arginina no local. Entretanto as condições de fixação utilizadas por êsses autôres foram diferentes. É provável que êsse fator tenha influido nos resultados, embora não se deva esquecer que a zona I produziu reação positiva na presente pesquisa. Também não está afastada a hipótese de que os radicais guanidílicos presentes na dentina reparativa necessitem de uma prévia liberação para poder reagir.

#### Desaminação

Conforme era previsto, a desaminação produziu uma drástica redução na coloração pelo Orange G. Tôdas as estruturas da dentina reparativa perderam grande parte de sua coloração, demonstrando que esta era mesmo devida, em grande parte, a grupos protéicos.

#### d) Métodos para lipídeos

Não foi constatada positividade da junção dentina primária - dentina reparativa ao Sudan Black, o mesmo acontecendo na área intercanalicular. A fraca reação positiva observada nos prolongamentos de Tomes confirmou os achados de WISLOCKI e col. (1948) e de ALLRED (1966) que detectaram lipídeos nos prolongamentos de Tomes da dentina normal.

A reação sudanófila observada na zona pericanalicular da dentina reparativa demonstrou que essa estrutura possui lipídeos. ALLRED (1966) afirmou que a matriz pericanalicular da

dentina primária possui fosfolipídios, muito provavelmente a lecitina. Embora não se haja pesquisado a natureza dos lipídios - nesta pesquisa, os resultados de ALLRED parecem confirmar os aqui encontrados.

### 5.5.3 - Ultraestrutura

#### a) Dicroísmo

A dentina reparativa possui dicroísmo mais facilmente reconhecível que a dentina primária, provavelmente por se tratar de uma estrutura que contém grande fração protéica, aliada ao fato de possuir poucos canalículos, propiciando assim uma melhor distinção da área intercanalicular, onde o fenômeno é bem observado. O dicroísmo da dentina reparativa comprova a ordenação molecular dos mucopolissacarídeos ácidos na região.

#### b) Birrefringência

##### Dentes descalcificados e desgastados

De uma maneira geral, não houve diferença de aspectos entre os dentes descalcificados e desgastados na dentina reparativa, quando examinados em luz polarizada. Foi comprovada a grande predominância de colágeno na dentina reparativa, comprovada pela marcada birrefringência dos feixes fibrosos, cuja direção predominante é perpendicular aos canalículos. Entretanto, existem feixes de colágeno que seguem orientação diferente, o que pode ser comprovado através da birrefringência persistente mesmo no ponto de extinção da zona.

A dentina pericanalicular apresentou birrefringência persistente mesmo no ponto de extinção, o que sugere, a exemplo do que acontece na dentina primária, que a área pericanalicular da dentina reparativa possui fibrilas colágenas de trajeto espiralado. SASSO e col. (1966) comunicaram a existência, nessa área, de "cruzes de polarização". Conforme já foi discutido anteriormente, essas "cruzes de polarização" são apenas resultado da birrefringência combinada das fibrilas espiraladas da dentina pericanalicular e das fibras perpendiculares aos canalículos, provenientes da dentina intercanalicular, não sendo portanto as verdadeiras cruzes de polarização.

O interior dos canalículos apresentou-se escuro e de difícil visualização, em virtude da extrema exiguidade de sua luz, tornando temerárias quaisquer observações sobre o seu conteúdo.

Dentes descalcificados e desgastados examinados com compensador de gesso vermelho de primeira ordem.

Os dentes descalcificados não produziram boas observações, provavelmente por causa da pequena quantidade de material, sendo que as imagens foram bastante prejudicadas, confundindo-se com o fundo do campo. Em vista disso, a discussão será baseada nos resultados produzidos pelos dentes desgastados.

Foi comprovada a natureza birrefringente positiva da dentina de reparação. As zonas amarelas de primeira ordem observadas em algumas regiões intercanaliculares representam regiões onde as fibras de colágeno possuem orientação contrária. CAVANHA (1959-1960 b) observou que essas zonas amarelas de primeira ordem seriam locais de concentração de cristais de apatita, sendo birrefringentes negativas. Como tais zonas são birrefringentes também sem o compensador, a hipótese de que se trata de zonas calcificadas parece estar afastada.

A dentina pericanalicular comprovou os resultados obtidos nos exames sem compensador. Ela é birrefringente positiva, apresentando zonas amarelas de primeira ordem em virtude da peculiar disposição espiralada de suas fibras colágenas.

\*  
\* \*

## 6 - CONCLUSÕES

1) A cárie parece provocar uma queda no índice de refração das estruturas da dentina. A dentina esclerosada, ao contrário, não parece ter sofrido queda do seu índice de refração.

2) Tudo indica que os mucopolissacarídeos ácidos são dissociados do colágeno, nas regiões de cárie de dentina.

3) Na zona superficial de desorganização total (zona 1) os mucopolissacarídeos ácidos estão ainda presentes, embora não tenha sido possível determinar a sua origem (ou origens). Além de mucopolissacarídeos ácidos, encontram-se ~~lipídios~~ polissacarídeos neutros, proteínas (colágeno, grupos amino, arginina) além de, possivelmente, restos inorgânicos.

4) Na zona de alteração estrutural dos canalículos e da matriz dentinária (zona 2), os mucopolissacarídeos ácidos foram despolimerizados na matriz intercanalicular. Os remanescentes da matriz pericanalicular conservam ainda a presença de mucopolissacarídeos ácidos, o que parece indicar que tal matriz é mais preservada que a matriz intercanalicular, no processo de cárie.

5) Na região profunda da zona 2, os mucopolissacarídeos ácidos sofreram dissociação do colágeno, havendo liberação de grupos reativos, o que parece produzir um aumento das reações específicas para mucopolissacarídeos ácidos.

6) A dentina esclerosada (zona 3) sofreu uma ligeira diminuição do seu conteúdo de mucopolissacarídeos ácidos, na área pericanalicular. A área intercanalicular não demonstrou indícios de alteração nos mucopolissacarídeos ácidos.

7) A dentina cariada perdeu a orientação molecular de mucopolissacarídeos ácidos, fato evidenciado pela perda de dicroísmo.

8) O colágeno da zona 1 sofreu alteração parcial, guardando ainda determinado grau de orientação molecular. O mesmo sucedeu com o colágeno da zona 2.

9) A dentina cariada possui um ponto isoelétrico aparente mais baixo que a dentina normal.

10) Na dentina esclerosada, as fibras de colágeno sofreram uma mudança de direção, diferindo das fibras da dentina normal em cerca de 30°.

11) O material acumulado no interior dos canalículos da dentina cariada é composto de mucopolissacarídeos ácidos (carboxílicos e sulfatados), polissacarídeos neutros (que não o glicogênio), proteínas, lipídeos, cristais inorgânicos e bactérias.

12) As granulações intracanaliculares observadas nos canalículos alterados parecem ser constituídas de um complexo lipoprotéico.

13) A região da junção dentina primária - dentina reparativa demonstrou ser uma zona que é rica em mucopolissacarídeos ácidos e proteínas, mais exatamente, colágeno. Contém ainda polissacarídeos neutros em quantidade mais elevada que a dentina normal.

14) A dentina reparativa parece possuir índice de refração bastante aproximado do índice de refração da dentina normal, não havendo diferença nos resultados obtidos com contraste de fase.

15) A dentina reparativa é um tecido que contém elevado teor de colágeno. É uma estrutura birrefringente positiva, encerrando algumas áreas onde a direção das fibras de colágeno é diferente da direção predominante das fibras. As suas reações químicas são, de uma maneira geral, semelhantes às daquelas da dentina normal.

\*

\* \*

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARMSTRONG, W.G. - 1958 - Modification of the Organic Matrix of Sound Dentine to Collagenase. Resistant Forms. J. dent. Res., 37: 1016-1034.
- \_\_\_\_\_ - 1959 - Investigation Into Collagenase Resistance of Carious Dentine - J.dent.Res., 38: 1217, Abs.
- \_\_\_\_\_ -1963 a- Fluorescence Characteristics of Sound and Carious Human Dentine Preparations - Arch.oral Biol. 8:79-90.
- \_\_\_\_\_ -1963 b- Presence of Ultraviolet Absorbing Material and its relation to Fluorescence "Quenching" Effects in Carious Dentine - Arch.oral Biol., 8:223-231.
- \_\_\_\_\_ -1964 a- Modifications of the Properties and Composition of the Dentin Matrix Caused by Dental Caries - Adv.oral Biol., 1:309-332.
- \_\_\_\_\_ -1964 b- Chemistry of Carious Enamel and Dentin - J.dent.Res., 43 (sup): 1002-1006.
- ALLRED, H. -1966 a- Histochemical Observations on the Lipids of Carious Human Dentine - Nature, 210: 748.
- \_\_\_\_\_ -1966 b- Histochemical Observations on the Lipids of Sound Human Dentine - Nature, 210: 646-647.
- BANEZ, L.O.N. & JOHANSEN, E. - 1964 - Correlated Soft X-Ray Electron Microscopic Studies of Selected Areas of Carious Dentin - J.dent.Res., 43: 850-851.
- BAKER, J.R. - 1947 - Q.Jl.microsc.Sci., 85: 1, apud PEARSE, A.G.-E. - 1960, op. cit. p. 799.
- BANGA, I. & BALÓ, J. - 1965 - Correlation between Crosslinkages, Steric Structure and Digestibility of Collagen - Biochemische Zeits., 342: 330-336.
- BENEDICT, H.C. - 1929 - The Fluorescence of Teeth as Another Method of Attack on the Problem of Dental Caries. J.dent. Res., 9: 274-275, abs.
- BENZER, S. - 1948 - Development and Morphology of Physiological - Secondary Dentin - J.dent.Res., 27: 640-646.
- BERNICK, S., WARREN, O. & BAKER, R.F. - 1954 - Electron Microscopy of Carious Dentin - J.dent.Res., 33: 20-26.
- BEUST, T.B. -1933aa- Reactions of the Dentin to Advancing Caries- J.A.D.A., 20: 631-638.
- \_\_\_\_\_ -1933 b- Inflammatory Zones in the Dentine - J. dent. Res., 13: 399-405.

- BEUST, T.B. - 1936 - Enamel and Dentin Metabolism Illustrated by Reactions to Caries - J.A.D.A., 23: 827-834.
- BEVELANDER, G. & BENZER, S. - 1943 - Morphology and Incidence of Secondary Dentin in Human Teeth - J.A.D.A., 30: 1075-1082.
- BODECKER, C.F. - 1931 - The Lipid Content of Dental Tissues in Relation to Decay - J.dent.Res., 11: 277-284.
- BRADFORD, E.W. - 1957 - Early Matrix Changes in Caries of the Dentin - J.dent.Res., 36: 809, Abs.
- \_\_\_\_\_ -1958 a- Dentine Destruction by Caries - J.dent. Res., 37: 754, Abs.
- \_\_\_\_\_ -1958 b- The Maturation of the Dentine -Brit.Dent. J., 105: 212-216.
- \_\_\_\_\_ - 1960 - Dentine, a Barrier to Caries-Brit.Dent.J. 109: 387-393.
- BRAIN, E.B. & EASTOE, J.E. - 1962 - Studies on the Descalcification of Dental Tissues for Histological Purposes - Brit. Dent. J., 112: 277-283.
- BURNETT, G.W. & SCHERP, H.W. - 1953 - Effects on Dentin of Proteolytic and Acidogenic Bacteria Isolated from the Carious Lesion - J.dent.Res., 32: 45-56.
- CAVANHA, A.O. - 1959-60 a - Dentina Secundária Observada sob Luz Polarizada em Diversos Meios de Embebição - An.Fac.Odont. U.Par., 1:23-30.
- \_\_\_\_\_ - 1959-60 b - Dentina Secundária Observada em Luz Polarizada - An.Fac.Odont.U.Par., 1: 43-46.
- CAPE, A.T. & KITCHIN, P.C. - 1930 - Histologic Phenomena of Tooth Tissues as Observed Under Polarized Light, with a Note on the Roentgen-Ray Spectra of Enamel and Dentin - J.A.D.A., 17: 193-227.
- CORBETT, M.E. - 1963 - Incidence of Secondary Dentine in Carious Teeth - Brit.Dent.J., 114: 142-146.
- COSTA, A.C. - 1943 - Manual de Técnica Histológica - 3ª Ed.- Livraria Portuguesa, pág. 215.
- DEITCH, A.C. - 1955 - Lab.Invest., 4: 324-351, apud LISON (1960)- op. cit. p. 326.
- DIRKSEN, T.R. - 1963 - Lipid Components of Sound and Carious Dentin - J.dent.Res., 42: 128-132.
- ENGEL, M.B. - 1950 - The Softening and Solution of Dentin in Caries. J.A.D.A., 40: 284-294.

- FISH, E.W. - 1930 - Lesions of the Dentin and their Significance in the Production of Dental Caries - J.A.D.A., 17: 992-1008.
- FISHER, E.R. & LILLIE, R.D. - 1954 - The Effect of Methylation on Basophilia - J.Histochem.Cytochem., 2: 81-87.
- FRANK, R.M., WOLF, F. & GUTMANN, B. - 1964 - Microscopie Electronique de la Carie Au Niveau de la Dentine Humaine - Arch.oral Biol., 9: 163-179.
- FUSAYAMA, T., OKUSE, K. & HOSODA, H. - 1966 - Relationship Between Hardness, Discoloration and Microbial Invasion in Carious Dentin. - J.dent.Res., 45: 1033-1046.
- GOTTLIEB, B. - 1946 - Formation of Secondary Dentin and Related Problems. J.dent.Res., 25: 29-34.
- GRADY, J.E. & YAEGER, J.A. - 1965 - Polarizing Microscopy of Abnormal Dentine Produced by Injection of Strontium or Fluoride. Arch.oral Biol., 10: 175-178.
- HABERMAN, S., BOUSCHOR, C., MATTHEWS, L. & SAUNDERS, E. - 1967 - Fine Structure of Soft Carious Dentine - O.Surg.,O.Med. & O.Path., 24: 216-223.
- HARCOURT, J.K. - 1964 - Further Observations on the Peritubular - Translucent Zone on Human Dentine - Aust.D.J., 9: 387-392.
- HESS, W.C. & LEE, C. - 1952 - Isolation of Chondroitin-Sulfuric Acid from Dentin - J.dent.Res., 31: 793-797.
- JOHANSEN, E. - 1962 - The Nature of the Carious Lesion - Dent. - Clin.North Amer., W.B. Saunders Co., 305-319.
- \_\_\_\_\_ - 1964 - Microstructure of Enamel and Dentin. J.dent. Res., 43: 1007-1020, Sup. 1039-1051.
- JOHANSEN, E. & PARKS, H.F. - 1962 - Electron Microscope Observations on Sound Human Dentine - Arch.oral Biol., 7: 185-193.
- JOHNSON, W.C., JOHNSON, B.F. & HELWIG, B.F. - 1962 - Effect of varying the pH on reactions for acid mucopolysaccharides. - J.Histochem.Cytochem., 10: 684.
- JOLLY, M. & SULLIVAN, H.R. - 1960 - The pathology of Carious Human Dentine - Aust.D.J., 5: 157.
- KAYE, H. & HEROLD, R.C. - 1966 - Structure of Human Dentine - (I) Phase Contrast, Polarization, Interference and Bright - Field Microscopic Observations on the Lateral Branch - System - Arch.oral Biol., 11: 335-368.
- KEIL, A. - 1955 - Polarizations Mikroskopische Untersuchungen am Kariösen Dentin - Dtsch.zahnarztl.Z., 10: 1525.

- KRAMER, I.R.H. - 1951 - Distribution of Collagen Fibrils in the Dentine Matrix - Brit.D.J., 91: 1-7.
- KRONFELD, R. - 1955 a - Histopatologia dos Dentes - 3ª ed., Editôra Científica, 152-167.
- \_\_\_\_\_ - 1955 b - Histopatologia dos Dentes - 3ª ed., Editôra Científica, 81-102.
- KUTTLER, Y. - 1959 - Classification of Dentine into Primary, Secondary and Tertiary - O.Surg.,O.Med. & O.Path., 12: - 996-1001.
- LANDSMEER, J.M.F. - 1951 - Acta Pharmac.Neerl. 2: 112, apud LISON, (1960) op. cit., p. 293.
- LENZ, H. - 1959 - Electromicroscopic Studies of the Organic Matrix of Enamel and Dentin - Dent,Abst., 4: 28-30.
- LEV, R. & SPICER, S.S. - 1964 - Specific Staining of Sulphate - Groups with Alcian Blue at Low pH - J.Histochem.Cytochem. 12: 309.
- LILLIE, R.D. - 1954 - Histopathologic Technic and Practical Histochemistry - The Blakiston Division, New York, p. 370.
- LISON, L. - 1954 - Stain Technol., 29:131. Apud LISON, L. (1960)-op. cit. p. 745.
- \_\_\_\_\_ -1960 a- Histoquímica et Cytoquímica Animales. Principes et Méthodes - Paris, Gauthier Villars. vol. II, p. 412-422.
- \_\_\_\_\_ -1960 b- Histoquímica et Cytoquímica Animales. Principes et Méthodes - Paris, Gauthier Villars. vol. I. p. 174.
- \_\_\_\_\_ -1960 c- Histoquímica et Cytoquímica Animales. Principes et Méthodes - Paris, Gauthier Villars. vol.II, p. 739.
- \_\_\_\_\_ -1960 d- Histoquímica et Cytoquímica Animales. Principes et Méthodes- Paris, Gauthier Villars, vol. II, p. 749.
- \_\_\_\_\_ -1960 e- Histoquímica et Cytoquímica Animales. Principes et Méthodes - Paris, Gauthier Villars, Vol. I, p. 325.
- \_\_\_\_\_ -1960 f- Histoquímica et Cytoquímica Animales. Principes et Méthodes - Paris, Gauthier Villars, Vol. I, p. 195.
- \_\_\_\_\_ -1960 g- Histoquímica et Cytoquímica Animales. Principes et Méthodes - Paris, Gauthier Villars, Vol. I, p. 293.
- LONGHI, L. & SASSO, W.S. - 1965 - Detecção Histoquímica de Mucopolissacarídeos na Zona Pericanalicular (Área Translúcida de Bradford) da Dentina Humana - Rev.Fac.Odont.S.Paulo, 3: 11-18.

- MACHA, N., ROMANI, N.F. & SASSO, W.S. - 1966 - Estudo Histoquímico dos Mucopolissacarídeos da Dentina Humana Cariada - Rev. Fac.Odont.S.Paulo, 4: 179-191.
- MARTENS, P.J., BRADFORD, E.W. & FRANK, R.M. - 1959 - Tissues Changes in Dentine - Internat.dent.J., 9: 330-348.
- Mc CLUNG'S HANDBOOK OF MICROSCOPICAL TECHNIQUE - 3d. Ed., Hafner - Publishing, Co., New York, 1961, p. 283-284.
- MILLER, W.A. - 1963 - Fat Staining in Carious Dentin - J.dent.Res. 42: 1100, Abst.
- MUNHOZ, C.O.G. - 1967 - Estudo histoquímico Comparativo (Proteínas e Carboidratos) das Glandulas Salivares Maiores de Tres Ordens de Mamiferos (Artiodactilos, Carnivoros e Roedores). Tese apresentada a Fac.Odont.de Piracicaba - p.68.
- OPDYKE, D.L. - 1960 - The Histochemistry of Dental Caries - J.dent.Res., 39: 698, Abst.
- OSSWALD, M. - 1963 - Collagen Structures in Dentin - Dent.Abst., - 8: 754.
- PEARSE, A.G.E. - 1960 - Histochemistry, Theoretical and Applied - 2nd. Ed. J.&A Churchill Ltd. p. 800.
- PISCHINGER, A. - 1926 - Z.Zellf., 3:169. Apud LISON (1960), op.cit. p. 733.
- PROPHET, A.S. - 1954 - Caries of the Dentin - J.dent.Res., 33:733, Abs.
- SARNAT, H. & MASSLER, M. - 1965 - Microstructure of Active and Arrested Caries - J.dent.Res., 44: 1389-1401.
- SASSO, W.S., ROMANI, N.F. & VILLA, N. - 1966 - Considerações sôbre algumas variedades de Dentina e sua Importância para a Patologia. I - Dentina Reparativa - Rev.Fac.Odont.S.Paulo, 4: 191-203.
- SAUNDERS, A.M. - 1964 - Histochemical Identification of Acid Mucopolysaccharides with Acridin Orange. J.Histochem.Cytochem. 12: 164-170.
- SCOTT, D.B. & ALBRIGHT, J.T. - 1954 - Electron Microscopy of Carious Enamel and Dentina - O.Surg.,O.Med. & O.Path., 7: 64-78.
- SELTZER, S. - 1959 - Reparative Dentinogenesis - O.Surg.,O.Med. & O.Path., 12: 595-602.
- SHROFF, F.R., WILLIAMSON, K.I., BERTAUD, W.S. & HALL, D.M. -1956 - Further Electron Microscope Studies of Dentine.Nature of the Odontoblast Process - O.Surg.,O.Med. & O.Path., 9: 432-443.

- SOLOMONS, C.C. - 1959 - Reactions of Orange G with Bone and Dentin Collagen - J.dent.Res., 37: 982-983.
- SPICER, S.S. - 1960 - A Correlative Study of the Histochemical Properties of Rodente Acid Mucopolysaccharides. J. Histochem. Cytochem., 8: 18-35.
- SPICER, S.S. & LILLIE, R.D. - 1959 - Saponification as a Means of Selectively Reversing the Methylation Blockade or Tissue Basophilia - J.Histochem.Cytochem, 7: 123-125.
- STANLEY, H.R., WHITE, C.L. & MC CRAY, L. - 1966 - Rate of Tertiary (Reparative) Dentin Formation in Human Tooth - O.Surg. - O.Med. & O.Path., 21: 180-189.
- STONES, H.H. - 1962 a - Oral and Dental Diseases - 4th. Ed., E.&S. Livingstone Ltd., Edinburgh and London, 311-321.
- \_\_\_\_\_ - 1962 b - Oral and Dental Diseases - 4th.Ed., E & S. Livingstone Ltd., Edinburgh and London, 332-339.
- SYMONS, N.B.B. - 1960 - Histochemical Study of Dentin - J.dent.Res. 39: 1.100, Abs.
- \_\_\_\_\_ - 1961 - A Histochemical Study of the Intertubular and Peritubular Matrices in Normal Human Dentine. Arch.-oral Biol., 5: 241-250.
- \_\_\_\_\_ - 1962 - Histochemical Study of the Odontoblast Process, Arch.oral Biol., 7: 455-462.
- TAKUMA, S. - 1960 - Electron Microscopy of the Structure Around the Dentinal Tubule - J.dent.Res., 39: 973-981, Abst.
- TAKUMA, S. & KURAHASHI, Y. - 1962 - Electron Microscopy of various Zones in a Carious Lesion in Human Dentina - Arch. oral Biol., 7: 439-453.
- TOTO, P.D. - 1967 - Dentine Caries - O.Surg., O.Med. & O.Path., 23: 215-220.
- VAN HUYSEN, G. - 1960 - Microstructure of Normal and Sclerosed Dentine - J.pros.Dent., 10: 976-982.
- VIDAL, B.C. - 1961 - Fenômenos da Defesa Encontrados na Dentina Durante a Cárie Dental - Rev.Un.Odont.Bras., 2: 72-73.
- \_\_\_\_\_ - 1963 - Pleochroism in Tendon and its Bearing to Acid Mucopolysaccharides - Protoplasma, 56: 529-536.
- \_\_\_\_\_ - 1964 a- The Part Played by the Mucopolysaccharides in the Form Birefringence of the Collagen - Protoplasma, 59: 472-479.

- VIDAL, B.C. -1964 b- Sôbre a Organização de Mucopolissacarídeos - Ácidos em Tendões Calcaneares de Cobaia - Tese apresentada à Fac.Odont.de Piracicaba, p. 24.
- 1964 c- Sôbre a Organização de Mucopolissacarídeos - Ácidos em Tendões Calcaneares de Cobaia - Tese apresentada à Fac.Odont.de Piracicaba, p. 41-42.
- 1967 - Interferometrisches Qualitatives und Quantitatives Studium des Menschlichen Dentins - Enviado para publicação no "Protoplasma".
- VIZIOLI, M.R. & FERNANDES, C. - 1965 - Gengiva Humana: Estudo de Morfologia em Microscopia de Fluorescência. Rev.Bio. - Oral, 3: 1-13.
- VIZIOLI, M.R. & VIDAL, B.C. - 1966 - Coriphosphin in Histochemistry of Acid Mucopolysaccharides - Rev.Biol.Oral, 4: 40-49.
- WISLOCKI, G.B., SINGER, M. & WALDO, C.M. - 1948 - Some Histochemical Reactions of Mucopolysaccharides, Glycogen, Lipids and Other Substances in Teeth - Anat.Rec., 101: 487-514.
- YAMAMOTO, K. - 1959 - Study on Structure Around Dentinal Tubule - Dent.Abst., 4: 2.
- YASUMA, A. & ITCHIKAWA, T. - 1953 - J.lab.Clin.Med., 41, Apud PEARSE, A.G.E. 1960, op. cit. p. 793.
- YOUNG, M.A. and MASSLER, M. - 1963 - Some Physical and Chemical Characteristics of Carious Dentine - Brit.dent.Journal, 115: 406-412.

\*

\* \*

## 8 - DOCUMENTAÇÃO FOTOGRAFICA

- FIG. 1 - Note-se a zona superficial completamente desorganizada (zona 1). A área imediatamente subjacente (zona 2) mostra canalículos obliterados e tonalidade mais clara da dentina cariada. Tricrômico de Mallory, 2,5 x 1,25 x 3,2 aumentados, luz monocromática, 640 mu.
- FIG. 2 - Aumento maior da figura anterior, notando-se com maiores detalhes as alterações da dentina. Tricrômico de Mallory, 6,3 x 1,25 x 3,2 aumentados.
- FIG. 3 - Aspecto das zonas 1 e 2 da dentina cariada, observadas em contraste de fase, meio de embebição, água destilada. Dente desgastado, 120 x.
- FIG. 4 - Dentina esclerosada (zona 3) observada em microscopia de contraste de fase; meio de embebição, água destilada. Note-se a ausência de quaisquer estruturas no interior dos canalículos, bem como a integridade das zonas inter e pericanalicular. Dente desgastado, 540 x.
- FIG. 5 - Zona 1 observada em microscopia de campo escuro. Observe-se a aparência leitosa da dentina descalcificada. Meio de embebição, água destilada. Dente descalcificado, 540 x.
- FIG. 6 - Zona 2 observada em microscopia de campo escuro. Note-se a higidez da dentina pericanalicular, na região profunda da zona 2 (abaixo, à esquerda). Meio de embebição, água destilada. Dente descalcificado, 240 x.

13/732

- FIG. 7 - Região superficial da zona 2 observada em microscopia de campo escuro; meio de embebição, água destilada. - Dente descalcificado, 540 x.
- FIG. 8 - Aspecto da zona 1, mostrando as diferentes reações das camadas interna e externa. Coloração pelo Azul de Toluidina pH 4. Luz monocromática, 590 mu, 120 x.
- FIG. 9 - Aspecto da região superficial da zona 2. Note-se a de-sagregação da dentina intercanalicular, com formação de cavidades, o material interno dos canaliculos e a ausência de reação metacromática na área intercanalicular. Azul de Toluidina, pH 4, 120 x.
- FIG. 10- Junção da região profunda da zona 2 com a zona 3 (dentina esclerosada). Note-se a ausência de material intracanalicular e a metacromasia da área pericanalicular da zona 3, além da acentuada metacromasia da região intercanalicular da porção profunda da zona 2. Azul de Toluidina, pH 4, 540 x.
- FIG. 11- Região profunda da zona 2. Observe-se a forte reação positiva do material intracanalicular e da dentina pericanalicular, ao passo que a área intercanalicular não exibiu reação. Azul de Alcian pH 1, luz monocromática, 610 mu, 540 x.
- FIG. 12- Zona 1, reação do Ácido periódico-Schiff (PAS). Luz monocromática, 460 mu, 40 x 2 x 3,2 aumentos.

- FIG. 13 - Região superficial da zona 2. Note-se os canalículos obliterados por substância fortemente PAS-positiva, e a positividade da dentina intercanalicular (acima, à esquerda). São positivas também as ramificações laterais dos canalículos. PAS, luz monocromática, 460 mu, 16 x 2 x 3,2 aumentados.
- FIG. 14 - Aspecto da região profunda da zona 2, com quase total desaparecimento da reação positiva da dentina intercanalicular. PAS, luz monocromática, 460 mu, 6,3 x 2 x 3,2 aumentados.
- FIG. 15 - Aspecto geral das zonas 1 e 2. PAS, luz monocromática, 460 mu, 6,3 x 1,25 x 3,2 aumentados.
- FIG. 16 - Zonas 1 e 2, aspecto geral após coloração pelo Orange G pH 1,7. Luz monocromática, 493 mu, 240 x.
- FIG. 17 - Mesma zona anterior, corada pelo Orange G pH 1,7, após desaminação pelo ácido nitroso. Luz monocromática, 493 mu, 240 x.
- FIG. 18 - Zonas 1 e 2, aspecto geral após coloração pelo Sudan Black. Note-se a positividade apresentada pela zona 1 e canalículos da zona 2, bem como ausência de positividade das dentinas inter e pericanalicular. Luz monocromática, 610 mu, 540 x.

- FIG. 19 - Corte transversal da dentina normal descalcificada, apresentando figuras birrefringentes em forma de cruz, conferidas pelas fibras de colágeno das matrizes peri e intercanalicular. Meio de embebição, água destilada. Luz ultravioleta polarizada, 546  $\mu$ , 16 x 1,25 x 3,2 - aumentados
- FIG. 20 - Mesma zona da figura 19, com uma rotação de 0,5 graus de analisador. Note-se o desaparecimento das figuras em forma de cruz, tornando-se evidente a birrefringência do interior dos canaliculos. Meio de embebição, água destilada. Luz ultravioleta polarizada, 546  $\mu$ , - 40 x 1,25 x 3,2 aumentos.
- FIG. 21 - Birrefringência das estruturas da dentina normal (dentinas inter e pericanalicular, e prolongamentos odontoblasticos). Meio de embebição, água destilada. Luz ultravioleta polarizada, 546  $\mu$ , 40 x 2 x 3,2 aumentos.
- FIG. 22 - Birrefringência da zona 1, orientada perpendicularmente aos canaliculos. Dente descalcificado, meio de embebição água destilada. Luz polarizada, 40 x 2 x 3,2 aumentos.
- FIG. 23 - Birrefringência da zona 1, ponto máximo de extinção. - Dente descalcificado, meio de embebição água destilada. Luz polarizada, 40 x 2 x 3,2 aumentos.
- FIG. 24 - Dente descalcificado não submetido à desparafinação, em corte transversal. Observe-se as cruces de polarização conferidas pela parafina, no interior dos canaliculos da dentina normal. Meio de embebição, água destilada.- Luz polarizada, 40 x 2 x 3,2 aumentos.

- FIG. 25 - Birrefringência da zona 1, paralelamente ao PPL, em dente desgastado. Meio de embebição, óleo mineral puro ("Nujol"). Luz polarizada, 2 x 3,2 aumentos.
- FIG. 26 - Birrefringência da zona 1, observada em dentes desgastados. Meio de embebição, óleo mineral puro ("Nujol"). Luz polarizada, 40 x 2 x 3,2 aumentos.
- FIG. 27 - Mesma área da figura 25, rotação de 90 graus em relação ao PPL. Meio de embebição, óleo mineral puro ("Nujol"). Luz polarizada, 2 x 3,2 aumentos.
- FIG. 28 - Mesma área da figura 26, ponto máximo de extinção. Meio de embebição, óleo mineral puro ("Nujol"). Luz polarizada, 40 x 2 x 3,2 aumentos.
- FIG. 29 - Aspecto da zona 1 e parte da região superficial da zona 2, mostrando aglomerados bacterianos em toda a zona 1 e nos canalículos e ramificações da zona 2. Coloração de Gram para tecidos, luz monocromática, 460 mu, - 40 x 2 x 3,2 aumentos.
- FIG. 30 - Região superficial da zona 2, mostrando cavidades e canalículos cheios de microorganismos. Coloração de Gram para tecidos, luz monocromática, 460 mu, 540 x 2 x 3,2 aumentos.

FIG.

- FIG. 31 - Dentina reparativa (clara), destacando-se da dentina primária normal (escura). Tricrômico de Mallory, luz monocromática, 530  $\mu$ , 120 x.
- FIG. 32 - Aumento maior da figura 31, na região da junção com a dentina primária normal. Tricrômico de Mallory, luz monocromática, 665  $\mu$ , 540 x.
- FIG. 33 - Dentina reparativa, mostrando a aparência leitosa decorrente da grande quantidade de colágeno existente na zona. Microscopia de campo escuro, dente descalcificado, 540 x.
- FIG. 34 - Dentina reparativa, mostrando a forte reação metacromática na junção com a dentina primária normal. Observe-se ainda a fraca metacromasia da área intercanalicular e o pequeno número de canaliculos. Azul de Toluidina - pH 4, luz monocromática, 560  $\mu$ , 240 x.
- FIG. 35 - Dentina reparativa, coloração pelo Orange G pH 1,7. Observe-se a forte reação positiva da dentina reparativa e da região limítrofe com a dentina primária normal. - Luz monocromática, 540  $\mu$ , 540 x.
- FIG. 36 - Dentina reparativa, dente desgastado, mostrando a forte birrefringência da região, com feixes de colágeno predominantemente orientados em sentido paralelo à superfície oclusal. Luz polarizada, 6,3 x 10/0,25 aumentos.

FIG. 37 - Aspecto total das zonas 1, 2 e 3. Note-se a diferença de coloração entre a zona 2 e a zona 3, imediatamente abaixo. Os canalículos da zona 2 aparecem obliterados por um material vermelho. Tricrômico de Mallory, 2,5 x 1,25 x 3,2 aumentos.

FIG. 38 - Outro aspecto das zonas cariadas, notando-se principalmente a diferença de coloração entre as zonas 2 e 3. Tricrômico de Mallory, 2,5 x 1,25 x 3,2 aumentos.

FIG. 39 - Aspecto da região superficial da zona 2, mostrando os canalículos distendidos obliterados por um material compacto, com fluorescência amarelo-alaranjada. Note-se a extensa destruição da dentina intercanalicular, com formação de cavidades. Corifosfina, 16 x 2 x 3,2 aumentos.

FIG. 40 - Zona mais profunda da dentina cariada, mostrando os canalículos obliterados por uma substância fluorescente amarelo-alaranjada. Corifosfina, 16 x 2 x 3,2 aumentos.

FIG. 41 - Aspecto de uma cárie de dentina, com formação de dentina esclerosada, de tonalidade amarela, imediatamente a baixo da lesão. Note-se a tonalidade azulada do restante da dentina normal. Luz polarizada, 2 x 3,2 aumentos.

FIG. 42 - Mesma zona da figura anterior, examinada na direção de rápida propagação do raio luminoso, quadrante negativo. Observe-se que a dentina esclerosada toma uma tonalidade de azulada, ao contrário das zonas adjacentes, mais amarelas. Luz polarizada, 2 x 3,2 aumentos.