

DEMONSTRAÇÃO DA MIELINA NA POLPA DENTÁRIA

Hardy Ebling

Catedrático de Histologia

SINOPSE

Estudou-se alguns métodos para a coloração da mielina em polpas «in situ» e discutiu-se vantagens e deficiências dos métodos efetuados. Os dentes foram descalcificados em ácido tricloroacético a 5% em solução aquosa e cortados em congelamento. Dos métodos discutidos, os melhores resultados foram obtidos pelo método de Chiffelle e Putt.

Introdução.

O levantamento levado a efeito por 16 professores das varias regiões do país, reunidos e tabulados por uma comissão de três e analisados e interpretados pelo Presidente da ABENO, mostrou que no tocante a Histologia, nas Faculdades de Odontologia, são deficientes 34,37% e não possuem instalações 31,25%. (11).

Este é o motivo da apresentação deste trabalho: facilitar ao principiante a escolha de um dos variados métodos para a coloração da mielina que reveste fibras nervosas da polpa dentária «in situ».

Material e métodos

Foram usados dentes humanos sem cárie, segundos pré-molares, extraídos com finalidades ortodônticas e enviados pelos Prof. Dr. José Ignacio Teixeira e José Veríssimo.

O material seguiu os seguintes passos:

1. Fixar os dentes com formol-cálcio-cádmio, de Baker (2), durante dois dias.
2. Descalcificar com ácido tricloroacético a 5%, em solução aquosa.
3. Lavar em água corrente durante 24 horas.

Este passo é necessário, principalmente, para que o ácido que permanece na peça não prejudique a navalha.

4. Cortar ao microtomo de congelamento, de preferência nas espessuras de 10, 15 e 20 micra, recebendo os cortes em água destilada.

É interessante cortar 100 ou mais cortes de um mesmo dente, arquivando em vidro com o respectivo protocolo, é usando como fixador o formol-cálcio-cádmio. Assim teremos estocado os cortes que serão utilizados a medida que fizermos as diferentes colorações. E só desta maneira poderemos comparar facilmente os resultados obtidos nas diferentes colorações.

Os métodos usados foram: Daddi, Boisseyon, Pearse, Chiffelle e Putt, Spielmeyer, P.A.S., e Feyerte.

Discussão.

Alguns investigadores (4,8), têm estudado a mielina destas fibras na polpa dentária. Os trabalhos, em geral, estudam a «polpa» isolada do dente. Com isso evitam a descálcificação. A técnica usada é partir o dente, em sentido longitudinal, com uma série de cuidados para evitar a dilaceração da «polpa». Todescan e Sasso (20), para a demonstração de lipídios na polpa, preconizam um interessante artifício para facilitar os cortes em congelção, de material de pequenas dimensões, como é o caso da polpa humana.

Entretanto em alguns casos e principalmente para o ensino é interessante obter cortes da polpa «in situ», e colorir a mielina nestes cortes.

Desde o trabalho de Baker (2), tem se dado preferência ao fixador de Baker. Este fixador, segundo Cain (6) e Berg (3), impede a di-

usão das gorduras no líquido fixador.

O método de Daddi, (9) que foi o primeiro a usar o Sudan III, foi seguido por ser extremamente simples, embora tenha limitações. Após o uso do Sudan III, pode-se colorir com hematoxilina deluída ao quinto, destacando-se deste modo a diferença entre a mielina e agulhas calcicas, uma forma de degeneração cálcica que pode existir, principalmente na polpa radicular. Usamos a hematoxilina Harris ou a férrica de Heidenhain.

O método de Pearse (19) que utiliza Sudan II e IV, dá bons resultados e grande nitidez, além de ser muito fácil de executar. Para tecidos que sofreram descálcificação, o tempo de exposição ao corante deve ser aumentado. Para evitar precipitados, deve-se seguir o procedimento de Vlackos, que será discutido adiante. O método de Pearse cora a mielina de vermelho tijolo e as hemácias de amarelo ouro, o que é vantajoso, pois ajuda a distinguir capilares de fibra mielinica. Este método baseia-se no fato de que agentes de coloração multifracionais para lipídios, colorem mais profundamente do que as frações puras que muitas vezes possuem baixa solubilidade e colorem pobremente ou não colorem. Isto foi demonstrado por Werner e Christman (22), Kay e Whitehead (13), Jencks e Durrum (12).

O método de Boisseyon dá bons resultados, desde que se aumente o tempo e que se aplique o processo de desaturação (21). Começa a

dar bons resultados com 15 minutos de exposição à solução corante. Algumas vezes pode ser necessário prolongar por horas, possivelmente dependendo do pH dos cortes.

O método de Feyerter (10) com tionina (lote 52217 E., Merck, Prüfung), em nossas mãos não deu resultados.

Possivelmente a explicação seja a mesma dada por Lillie (15). «de que só a tionina de uma firma germânica dá esta coloração metacromática da mielina».

Notamos a coloração quase instantânea da parte externa do periodonto que toma uma coloração vermelho-violácea. E não conseguimos a coloração da bainha de mielina, por mais que prolongássemos a exposição, que em alguns casos atingiu até 7 dias.

O método de Spielmeyer, modificado pela A.F.J.P. (17) demonstra muito bem a mielina, mas tem o inconveniente de colorir as hemácias fortemente. Dêste mesmo inconveniente padece o método de Baker (2) que colore mais fortemente as hemácias (1), bem como dá uma coloração de fundo que não favorece. Mesmo assim êstes dois métodos encontram aplicações.

O método de P.A.S., diferencia bem a mielina das hemácias, entretanto colore também uma série de outras estruturas. Quando o problema é diferenciar eritrócitos de mielina «eritrócitos coram-se intensamente pelo aquecimento prolongado pelo Sudan negro B, mas não

com o óleo vermelho O, ou o Sudan IV (16).

O método de Chiffelle e Putt deu os melhores resultados. Apesar de sofrer descoloração, quando há possibilidades de fotografar-se imediatamente após a coloração, para pesquisa e documentação, êle deve ser usado.

A alteração de cor de material colorido com Sudan negro B, foi bem estudada por Kutt, Lockwood e McDowell (14). «A alteração de cor do material colorido e a diminuição de intensidade aconselha examinar as amostras imediatamente após a coloração e em ausência de luz solar e de gases redutores».

Um dos problemas quando se trabalha com os Sudans é a frequência com que se dá precipitações, ou imediatamente, ou vários dias após. Isto pode ser evitado usando o processo de desaturação proposto por Vlackos (21), que é, em resumo, o seguinte:

— usar concentrações abaixo do ponto de saturação, isto é, 0,25 g de Sudan IV por 100 ml. de álcool 60%. Usar solução saturada mais igual volume de álcool a 60%. ou refrigerar a solução corante.

Obtivemos bons resultados fazendo as soluções em tubos de ensaio, com rolha de borracha e guardando no refrigerador. No momento de usar, com o auxílio de uma pipeta, retira-se parte da solução que sobrenada. Deve-se aumentar os tempos de exposição. Com êstes cuidados, dificilmente forma-se precipitado.

Agradecemos ao Dr. Aron Kac o trabalho fotográfico.

O material colorido pelo método de Baker, foi colorido pelo Prof. Dr. Milton Amaral, que tem realizado este método inúmeras vezes. Os cortes, fixados em formol cálcio, foram levados e coloridos na Faculdade de Odontologia de Pelotas. De tal modo a fotomicrografia número 5 foi colorida pelo Dr. Amaral, sobre cortes enviados. Nossos agradecimentos.

SYNOPSIS

Some methods of pulp myelin coloration «in situ» were studied. Advantages and deficiencies of the method applied were discussed. The teeth were decalcified with trichloroacetic acid at 5% in water solution and they were cut with congelation microtome. Among the methods discussed the best results were got by the Chiffelle and Putt Method.

BIBLIOGRAFIA

1. AMARAL, M. M. — Demonstração dos fosfolipídios na glândula submandibular (tese) Pelotas, 1960.
2. BAKER, J. R. — The structure and chemical composition of the Golgi element. *Quart. J. Micro. Sci.*, 85:72, 1944.
3. BERG, N. O. — A histological study of masked lipids. *Acta Path. Scand.*, sup. 90, 1951.
4. BRASHEAR, A. D. — The innervation of the teeth. *The Journal of Comparative Neurology*, 64:169, 1936.
5. BOISSEYON, P. — Une modification de la technique de coloration de la myeline au Noir Soudane B. *Bull. Histol. Appl. Physiolog. et Path.*, 18:90, 1941.
6. CAIN, A. J. — The histochemistry of lipoids in animals. *Biol. Rev. Cambridge Philosoph. Soc.*, 73:112, 1950.
7. CHIFFELLE, T. L. & PUTT, F. A. — Propylene and ethylene glycol as solvent for Sudan IV and Sudan Black B. *Stain Techn.*, 26:51, 1951.
8. CHRISTENSEN, K. — Sympathetic nerve fibers in the alveolar nerves and nerves of dental pulp. *Journal of Dental Research*, Chicago, 19:227, 1940.
9. DADDI, L. — Nouvelle méthode pour colorer la graisse dans les tissus. *Arch. Ital. Biol.*, 26:143, 1896.
10. FEYERTER, F. — Virchows Archiv. für jath. Anat. und Physiolog. klinische Medizin, Berlin, 296:695, 1936.
11. GUIMARAES Jr., Paulino — O ensino odontológico no Brasil. Rio de Janeiro, Capes, 1961.
12. JENCKS, W. P. & DURRUM, E. L. — Paper electrophoresis as a quantitative method; the staining of serum lipoproteins. *J. Clin. Investig.*, 34:1437-48, 1955.
13. KAY, W. W. & WHITEHEAD, R. — The role of impurities and mixtures of isomeres in the staining of fat by commercial Sudans. *J. Path. Bact.*, 53:279, 1941.

14. KUTT, H. et alii. — Decomposition of Sudan Black B by ultraviolet light and gases; its lipid and protein staining properties. *Stain Technology*, 34: 203, 1959.
15. LILLIE, R. D. — *Histopathologic technich and practical histochemistry*. New York, Blakiston, 1954. p. 306.
16. LILLIE, R. D., op. cit., p. 302.
17. MANUAL of histologic and special staining technics. Washington, Armed Forces Institute of Pathology, 1957.
18. MCMANUS, J. F. A. *Stain Technology*, 23:99, 1949.
19. PEARSE, A. G. E. — *Histoquímica; teorica y pratica*. Madrid, Aguilar, 1960.
20. TODESCAN, A. & SASSO, W. da Silva — De presença de lipídios na polpa dentaria. *Anais da Faculdade de Farmácia e Odontologia da Universidade de São Paulo*, 13:123, 1955.
21. VACKLOS, J. — Desaturation of staining solutions for lipids; a means of avoiding precipitation on stained sections. *Stain Technology*, 34:292, 1959.
22. WERNER, J. W. & CHRISTMAN, J. F. — Comparison of the fat stainnin gefficiency of fractions of commercial Sudan III separated by column chromatography. *Stain Technology*, 27:93, 1952.



Fig. 1. Aumento aproximado 100 diâmetros. Método de Daddi.

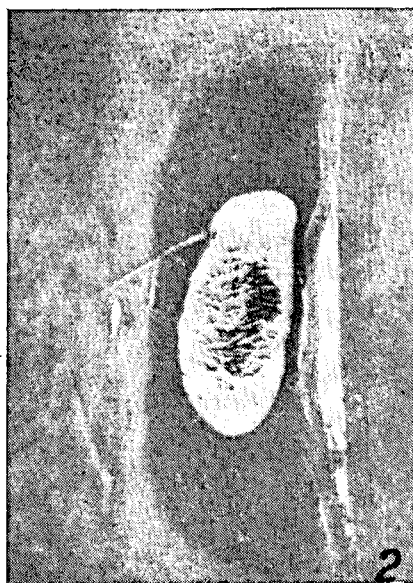


Fig. 2. Aumento aproximado 100 diâmetros. Método de Spielmeyer.

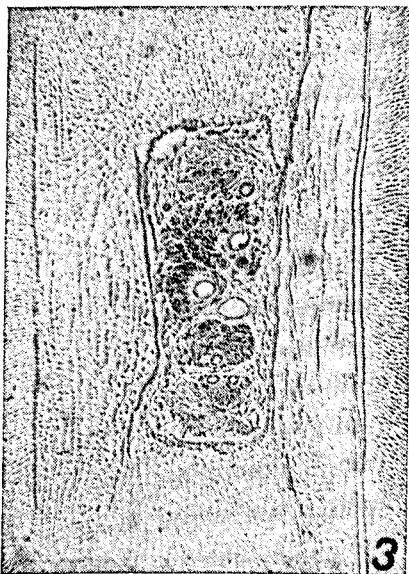


Fig. 3. Aumento aproximado 100 diâmetros. Método de Boissayon.

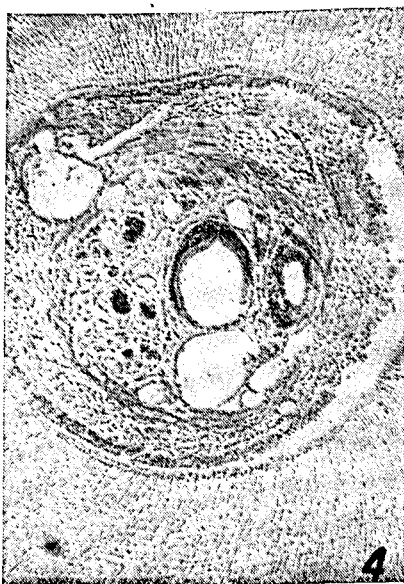


Fig. 4. Aumento aproximado 100 diâmetros. Sudan III e IV (Pearse).

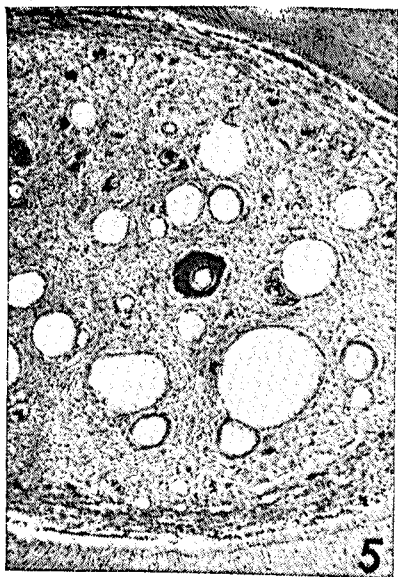


Fig. 5. Aumento aproximado 100 diâmetros. Método de Baker.



Fig. 6. Aumento aproximado 100 diâmetros. Sudan III e IV (Pearse).

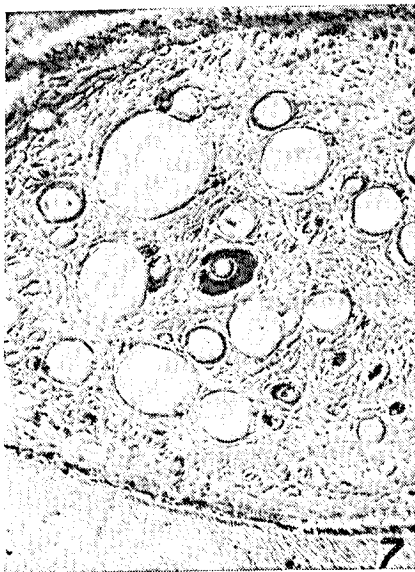


Fig. 7. Aumento aproximado 100 diâmetros. Método de Chiffelle e Putt.



Fig. 8. Aumento aproximado 450 diâmetros. Método de Chiffelle e Putt.