ESTRUTURA E INERVAÇÃO DA POLPA DENTÁRIA EM DENTES NORMAIS E PORTADORES DE LESÕES

Filipe Coimbra

Porto - 2001

ESTRUTURA E INERVAÇÃO DA POLPA DENTÁRIA EM DENTES NORMAIS E PORTADORES DE LESÕES

FILIPE POÇAS DE ALMEIDA COIMBRA
Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto

ESTRUTURA E INERVAÇÃO DA POLPA DENTÁRIA EM DENTES NORMAIS E PORTADORES DE LESÕES

PORTO
2001

Dissertação de candidatura ao grau
de Doutor apresentada à
Faculdade de Medicina Dentária da
Universidade do Porto

Conselho Científico da Faculdade de Medicina Dentária

Acácio Eduardo Soares Couto Jorge
Afonso Manuel Pinhão Ferreira
Américo dos Santos Afonso
António Cabral Campos Felino
António Manuel Guerra Capelas
Adão Fernando Pereira
Artur Rego Alves Pinho
César Fernando Coelho Leal da Silva
Durval Manuel Belo Moreira
Fernando Jorge Morais Branco
Fernando José Brandão Martins Peres
Francisco António Rebelo Morais Caldas
Germano Neves Pinto da Rocha
Irene Graça Azevedo Pina Vaz
João Carlos Antunes Sampaio Fernandes
João Carlos Gonçalves Ferreira Pinho
João Fernando Costa Carvalho
Jorge Manuel Carvalho Dias Lopes
José Albertino Cruz Lordelo
José Carlos Pina Almeida Rebelo
Manuel Pedro Fonseca Paulo
Maria Adelaide Macedo Carvalho Capelas
Maria Cristina Pinto Coelho Mendonça Figueiredo Pollmann
Maria Helena Raposo Fernandes
Maria Purificação Valenzuela Sampaio Tavares Cummings
Mário Jorge Rebolho Fernandes Silva
Miguel Fernando Silva Gonçalves Pinto
Rogério Serapião Martins Aguiar Branco

Professores Jubilados

Amílcar Almeida Oliveira
António Manuel Machado Capelas
Joaquim Augusto Figueiredo Dias
José Sena Silva Campos Neves
Manuel Desport Marques

Aos Professores Doutores

Miranda Magalhães
e
Fernando Peres

A meus Pais

A minha Esposa e minhas Filhas

Prólogo

O meu primeiro contacto com a Medicina, à semelhança da maioria dos alunos liceais que ingressam na Universidade, consistiu em tentar absorver a extensa matéria que todas as semanas era leccionada na cadeira de Anatomia. A prova não era fácil mas à custa de muitas tardes passadas no teatro anatómico, e depois de superada a repulsa inicial pelo contacto com o corpo humano inanimado, cheguei a entusiasmar-me por essa abordagem prática que de certo modo amenizava a árida matéria teórica. No segundo ano, pensei que o mais difícil estava feito e a partir daí tudo iria ser mais agradável. Não me podia ter enganado mais, a Histologia, a Fisiologia e a Química Fisiológica mostraram-me que não havia facilidades, e o único remédio era procurar dominá-las se quisesse acabar o curso. Quando entrei para o terceiro ano já estava pronto para tudo, no entanto tive a agradável surpresa de verificar que a matéria leccionada tinha uma componente mais próxima da prática clínica que nos levava a ver o organismo como um todo onde se integravam as doenças ou alterações dos vários órgãos ou sistemas.

Eu queria, no entanto, ser médico dentista e por isso nesse ano passei para a Escola de Medicina Dentária. Foi outro choque, pois em vez de continuar com o estudo propedêutico da Medicina percorrendo a semiologia das diversas afecções, passava a ter o dente como único objecto de estudo, uma entidade ainda por cima em grande parte constituída por materiais inorgânicos. No entanto, por dentro do invólucro frio do esmalte e da dentina vivia uma estrutura orgânica e funcional viva que comandava todo o conjunto – a polpa dentária. Os dois anos seguintes foram muito absorventes, consagrados ao intenso treino clínico e ao exercício do contacto directo com o doente.

Terminado o curso era então ainda relativamente fácil conseguir clientela e desenvolver uma actividade clínica permanente que preenchesse todos os dias da semana. No entanto sentia a falta da vida académica e o afastamento progressivo dos colegas tornava-se desagradável. Foi então que

surgiu o convite do saudoso e malogrado Professor António Gonzalez para dar aulas como seu assistente de Medicina Oral, convite esse que jamais esquecerei. Sendo o meu pai então director do Instituto de Histologia da Faculdade de Medicina, o Professor Gonzalez estimulou-me a desenvolver lá trabalho de investigação na área da morfologia dentária. Foi a partir desse momento que surgiu o propósito de desenvolver o estudo que com muitas deficiências agora toma forma e me atrevo a apresentar.

Desejo agradecer ao Professor Fernando Peres o grande apoio prestado ao longo de todos estes anos, sem o qual não teria sido possível a minha formação como médico dentista e docente. Ao Professor Miranda Magalhães, meu orientador nesta dissertação, e actual director do Instituto de Histologia e Embriologia, confesso a maior gratidão pelos valiosos conselhos dispensados e as facilidades postas à minha disposição. Ao Professor Artur Osório, regente da cadeira de Medicina Oral de que tenho sido assistente, agradeço o permanente apoio recebido. Ao Dr. António Avelino devo uma preciosa ajuda na investigação laboratorial, e na iniciação nas técnicas imunocitoquímicas, e ao Professor Castro Lopes o aconselhamento amigo e uma grande disponibilidade.

Estou ainda muito grato aos técnicos de Histologia José Pedro Santos Neves, D. Alice Guimarães, D. Elisa Maria Nova e D. Maria Amélia Ferreira que me ajudaram nas técnicas laboratoriais. A D. Maria Teresa Laranjeira que foi inexcedível de eficiência e perfeição nas tarefas de secretaria. A D. Ana Maria Faustino e D. Maria Alice Silva, que me auxiliaram na preparação da iconografia. Finalmente não posso omitir o contributo de meu pai pela ajuda constante que me prestou ao longo de todo o trabalho.

Parte do material incluído na tese saiu publicado com o seguinte título:

— Coimbra, F. and Coimbra A. — Dental noxious input reaches the subnucleus caudalis of the trigeminal complex in the rat, as shown by c-*fos* expression upon thermal or mechanical stimulation. *Neuroscience Letters* 173 (1994) 201-204.

Abreviaturas

AMPA	receptor glutamatérgico ionotrópico de tipo excitador
C_1	primeiro segmento cervical da espinal medula
C_2	segundo segmento cervical da espinal medula
CGRP	peptídeo relacionado, e codificado, pelo gene da calcitonina
CTb	subunidade B da toxina da cólera
HRP	peroxidase do rábano
IO	oliva inferior
IR	imunorreactivo
IRF	formação reticular intermédia correspondendo à área noradrenérgica A_1 na porção dorsolateral do bolbo ventrolateral caudal
ME	microscopia electrónica
ML	microscopia de luz
NGF	factor de crescimento nervoso
NPY	neuropeptídeo Y
SOL	núcleo do feixe ou tracto solitário
SP	substância P
Vc	subnúcleo caudal do núcleo espinal do trigémeo
Vi	subnúcleo interpolar do núcleo espinal do trigémeo
VIP	peptídeo intestinal vasoactivo
WGA-HRP	aglutinina do germe do trigo acoplada à peroxidase do rábano

ÍNDICE

INTRODUÇÃO 19

Organização da Polpa 22
Células 22
Material extracelular 23
Vasos sanguíneos 25

Inervação 26
Aspectos gerais 26
Inervação sensitiva 27
Inervação autónoma 31

Projecções Sensitivas Bulbares 33

Projecções Ganglionares 37

Aspectos Patológicos e Experimentais 39
Cárie 39
Outras agressões 44
Polpa e periodonto 45

Perspectivas do Trabalho 46

MATERIAIS E MÉTODOS 51

Material Humano 53
Dentes não descalcificados 53
Dentes descalcificados 55

Material Experimental 56
Técnicas gerais 56
Experiências efectuadas 58

RESULTADOS 63

Estrutura Pulpar 65

Inervação Pulpar 67

Projecções Nociceptivas Bulbares 69

Projecções Ganglionares 72

Alterações Patológicas e Experimentais 73
Cárie 73
Periodontose 74
Cavitação provocada 75
Estimulação térmica 75

DISCUSSÃO 77

Estroma Pulpar Normal 79

Rede Nervosa Sensitiva 82
Nervos mielínicos 82
Nervos amielínicos 85

Inervação Autónoma 89

Sensibilidade Dentária e Projecções Bulbares 91

Reacção Pulpar às Agressões 94
Cárie e cavitação 94
Agressão térmica 99
Periodontose 100

Conclusões 102

RESUMO 105
SUMMARY 111
BIBLIOGRAFIA 117
ILUSTRAÇÕES 135

INTRODUÇÃO

De há muito se sabe que a polpa constitui o substrato biológico da vitalidade dentária. Como sede da vascularização do dente, ela veicula os nutrientes de que dependem as células dos vários componentes dentários incluindo os odontoblastos e, consequentemente, o principal material duro por eles elaborado, a dentina. Embora ocupando um espaço exíguo e fechado, a polpa possui uma enorme complexidade de elementos celulares e extracelulares pertencentes ao tecido conjuntivo, adaptados a um universo anatomofuncional peculiar, e talvez por isso ainda não inteiramente conhecidos nos mais íntimos detalhes.

A polpa é, além disso, o local onde principalmente se situa a inervação dentária. Aí se ramificam as redes nervosas terminais do sistema sensitivo somático que conferem sensibilidade dolorosa à dentina e à própria polpa, assim como aí reside a inervação motora autónoma que regula o tónus dos vasos sanguíneos. Parecendo relativamente simples, a organização morfofuncional da polpa condiciona a capacidade de reacção do dente às agressões que sofre, as quais primariamente atingem as camadas calcificadas que a cercam. As respostas incluem uma panóplia de adaptações implicando uma remodelação da rede nervosa, relacionada com fenómenos inflamatórios complexos e a intervenção de elementos celulares de tipo imunitário.

Esta dissertação tem por objectivo principal contribuir para um melhor conhecimento da rede de inervação pulpar e dentinária, sua origem no tronco cerebral e no gânglio semilunar, suas modificações no decurso da cárie e da doença periodontal, assim como após estimulações térmica e mecânica (cavitação experimental) da dentina. Sendo um estudo essencialmente morfológico, houve também que fazer um exame detalhado da organização histológica da polpa.

Antes de expormos os resultados obtidos faremos um breve apanhado dos conhecimentos actuais no concernente à estrutura e inervação da polpa, dando particular relevo à reacção nervosa às agressões externas sofridas pelo dente.

Organização da Polpa

Células

À periferia da polpa ocorre a palissada contínua dos odontoblastos, só interrompida no forâmen apical, que embora especializados na secreção de dentina são parte integrante da polpa. De facto, aparecem pela primeira vez durante o desenvolvimento do sino dentário no ectomesênquima da papila dentária onde de início se torna impossível distingui-los das células não-formadoras de dentina. É hoje geralmente aceite que o ectomesênquima papilar resulta da migração das células da crista neural cranial nos anfíbios, aves e mamíferos (Lumsden, 1985). Tanto os odontoblastos prospectivos, como os futuros fibroblastos livres da polpa, têm provavelmente a mesma origem em células da crista neural, o que estaria de acordo com a hipótese de que no dente já formado os fibroblastos da camada celular da polpa, subjacentes à camada odontoblástica e dela separados pela zona acelular de Weil, se possam diferenciar em odontoblastos no decurso das reacções do dente às agressões externas, nomeadamente durante a formação da dentina reparadora (Shuttleworth, 1990a; Magloire et al., 1992; Fitzgerald, 1979). Não se tem, no entanto, chamado até agora a atenção para quaisquer diferenças estruturais entre os fibroblastos da camada celular e os restantes fibroblastos da polpa.

Os fibroblastos da polpa foram denominados pulpoblastos ou pulpócitos, de acordo com o grau de maturação, por Baume (1980), dada a sua origem na crista neural distinta da origem mesodérmica dos fibroblastos da maioria dos tecidos conjuntivos do organismo. Distinguem-se dos odontoblastos por não ostentarem qualquer polarização morfofuncional. Possuem no entanto idêntica capacidade de elaborar matriz conjuntiva extracelular. Mas enquanto os odontoblastos têm, tal como as células acinosas pancreáticas, os dispositivos de síntese proteica orientados para o polo apical por onde serão

excretados o colagéneo e as glicoproteínas da dentina, os fibroblastos da polpa, a que chamaremos genericamente pulpócitos, apresentam os organelos dispersos por toda a célula. É de crer que as secreções dos pulpócitos, mesmo dos mais jovens (pulpoblastos), se formem a um ritmo mais lento que a dentina dado possuírem um retículo endoplásmico muito menos rico.

Outros elementos celulares presentes são as células de Schwann das fibras nervosas mielínicas e amielínicas, que no microscópio de luz se vislumbram como núcleos disseminados entre as baínhas mielínicas dos feixes vásculo-nervosos. Os elementos endoteliais e musculares lisos dos vasos sanguíneos não diferem dos encontrados em outros tecidos conjuntivos, mas os pericitos dos capilares reconhecem-se com dificuldade ao microscópio de luz. Na polpa normal a presença de células imunitárias, tais como macrófagos, mastócitos e linfócitos B ou T, era até há pouco considerada muito discreta. Estudos recentes, todavia, chamaram a atenção para o facto de na polpa normal ocorrer um contingente notório de células apresentadoras de antigénios que exprimem os antigénios codificados pelos genes do complexo principal de histocompatibilidade HLA II no homem ou HMC II no rato (Roitt et al., 1985). Na polpa normal pertencem ao tipo morfológico das células dendríticas, com prolongamentos sinuosos, ou ao tipo macrofágico, redondo ou oval (Okiji et al., 1992). Ambas variam de número e distribuição em situações patológicas (Ohshima et al., 1995).

Material extracelular

O aspecto homogéneo do fundo intercelular nas colorações histológicas de rotina, com a ausência aparente de estruturas fibrosas, levou à classificação deste tecido conjuntivo como "mucoso" nos antigos manuais de Histologia. Tal como a geleia de Wharton do cordão umbilical, a matriz extracelular da polpa seria virtualmente desprovida de fibras e essencialmente constituída por um gel amorfo. No entanto, o exame ultrastrutural veio revelar a ocor-

rência de fibrilas colagéneas, geralmente não agregadas em feixes grossos, que predominavam à volta dos vasos e nervos (Seltzer e Bender, 1990). Elas seriam constituídas por reticulina com base na análise bioquímica dos subtipos moleculares de tropocolagéneo. O predominante na polpa é efectivamente o subtipo III, usualmente associado à reticulina, perfazendo 43% do colagéneo existente na polpa do dente humano e 40% na dos bovinos (Shuttleworth, 1990b). Em menor concentração ocorria o subtipo I que constitui as fibras colagéneas predominantes no conectivo da maioria dos tecidos conjuntivos moles do organismo, tais como derme, tendões e aponevroses, atmosferas conjuntivas das vísceras, e também nos ossos. Notou-se a existência de algum colagéneo dos isotipos II, V e VI e escasso colagéneo do isotipo afribilar IV provavelmente situado nas lâminas basais que cercam as células de Schwann das fibras nervosas. Os fibroblastos da polpa cultivados *in vitro* mostraram capacidade de sintetizar os diferentes isotipos do colagéneo com excepção do VI (Shuttleworth, 1990b) e ainda as proteínas multifuncionais com estrutura molecular fibrilar mas organização ultrastrutural não fibrosa, designadas por fibronectina e tenascina. Por outro lado, na polpa dentária não foi demonstrada histologicamente a ocorrência de fibras elásticas no estroma fora das arteríolas (Avery, 1991). A análise bioquímica não demonstrou igualmente a ocorrência local de elastina. Todavia, feixes de microfibrilas de 10 nm com a aparência e a colorabilidade de fibras oxitalânicas foram descritas ao microscópio electrónico na polpa de dentes decíduos e permanentes (Bradamante et al., 1980).

Abundante material extracelular amorfo tem sido identificado bioquimicamente na polpa humana e bovina. Nele avultam os proteoglicanos em que a uma cadeia central de ácido hialurónico se prendem proteínas fibrilares tendo cada uma apensas numerosas cadeias de glicosaminoglicanos (Stryer, 1995). A análise bioquímica tem revelado abundância de condroitino-sulfato-4 com ausência de condroitino-sulfato-6 e de sulfato de heparano. Há elevada concentração dos sulfatos de queratano e de dermatano (Van Amerongen et al., 1990). Dada a grande afinidade para o cálcio dos condroi-

tino-sulfatos, a ocorrência destes parece favorecer a dentinogénese (Linde, 1973), enquanto o sulfato de dermatano parece incrementar a fibrilogénese do colagéneo (Obrink, 1973). O ácido hialurónico tem reconhecidas funções como retensor de água nos tecidos.

Vasos sanguíneos

A polpa é rica em vasos. Os arteriais provêm das artérias alveolares, ramos da maxilar interna, que penetram na raíz dentária pelo canal apical ou pelos canais acessórios depois de atravessarem o periodonto (Seltzer e Bender, 1990). As artérias acabadas de chegar à polpa são ainda algumas de médio calibre, mas a maioria na polpa humana são arteríolas com diâmetro de 50 a 100 μm sem limitante elástica interna e com 3 a 5 fiadas de miócitos lisos na média (Avery, 1991). Na adventícia há uma maior presença de fibrilas colagéneas do que no estroma envolvente. Quando a muscular tem uma única camada de fibras musculares ou ela é descontínua, o vaso pode considerar-se arteríola pré-capilar. O plexo capilar terminal ocorre perifericamente na camada acelular por baixo dos odontoblastos e é constituído por típicos capilares contínuos com complexos de união entre as células endoteliais. Contudo alguns têm sido referidos como do tipo fenestrado com orifícios no citoplasma das células endoteliais (Seltzer e Bender, 1990). A lâmina basal destas é porém sempre contínua. A rede capilar origina vénulas que se congregam em veias com diâmetros semelhantes aos dos vasos arteriais, sem limitantes elásticas, parede mais fina e de espessura irregular, e adventícia praticamente inexistente. Dada a incompressibilidade da polpa, a capacidade de dilatação pela onda sistólica da parede arteriolar é reduzida e o fluxo plasmático relativamente rápido com valores de 0,3 a 1 mm por segundo. Ele decresce para valores inferiores a 0,1 mm/seg, ou menos, nos capilares e nas vénulas (Avery, 1991). Os estudos com moldes intravasculares de resinas mostraram que nas artérias a superfície luminal das células endoteliais tem

contorno fusiforme, enquanto nas veias o contorno é ovóide (Kishi e Takahashi, 1990). Este método é propício à evidenciação das numerosas anastomoses artério-venosas existentes.

Inervação

Aspectos Gerais

A configuração geral da rede nervosa pulpar é conhecida desde os trabalhos anatómicos efectuados com impregnações argênticas (Bernick, 1948; Fearnhead, 1957). Os troncos nervosos, ramos dos nervos alveolares superiores ou inferiores (Brodal, 1974), oriundos do trigémeo, atingem a polpa juntamente com as artérias nutritivas dos dentes através do forâmen apical ou dos canais acessórios. Os vasos e os nervos correm a princípio juntos em feixes vásculo-nervosos. Em seguida, as fibras nervosas separam-se dos vasos sanguíneos dicotomizando-se sucessivamente num leque de ramos mais finos em direcção à câmara pulpar onde dão origem ao denso plexo terminal de Raschkow situado na zona acelular de Weil entre a base dos odontoblastos e a camada celular da polpa. Todavia, na polpa radicular, alguns colaterais dos troncos nervosos da zona apical destacam-se desde logo em direcção à dentina apical sem formarem um plexo pré-terminal (Johnsen, 1985).

Estudos ultrastruturais (Johnsen, 1990) entretanto revelaram que nos nervos que penetram no dente existem já fibras mielínicas e amielínicas. As primeiras são quase todas finas na polpa, com baínha de mielina delgada, característica das fibras sensitivas Aδ, com velocidades de condução inferiores a 30 m/s (Nähri, 1990). As fibras mielínicas sensitivas mais grossas Aβ apenas perfazem 7% da totalidade das fibras mielínicas pulpares (Nair et al., 1992). Os fascículos nervosos contendo nervos mielínicos e amielínicos não parecem possuir perineuro (Nair, 1995). A coexistência dos dois contingen-

tes, amielínico e mielínico fino, ocorre em todas as zonas da rede nervosa pulpar com número de fibras amielínicas várias vezes superior ao de fibras mielínicas nos dentes decíduos e permanentes (Johnsen, 1990). Do plexo de Raschkow desprendem-se filetes nervosos, desprovidos de mielina (Byers, 1984), que contornam os odontoblastos e se insinuam longitudinalmente nos túbulos dentinários, geralmente uma fibra por canal, numa extensão de 100 a 200 μm (Gunji, 1982; Lilja, 1979).

Inervação sensitiva

Desde sempre a maioria dos nervos do dente foram considerados de natureza sensitivo-somática e nociceptiva, pelo facto de se originarem no trigémeo, e por ser a dor o componente primacial da sensibilidade dentária. Os trabalhos de electrofisiologia no animal de experiência vieram reforçar este conceito.

Os registos electrofisiológicos obtidos nos nervos alveolares do cão, gato ou macaco, após estimulação mecânica da dentina por perfuração com brocas, dessecação brusca da dentina exposta por jacto de ar, aquecimento rápido, ou aplicação de solutos hiperosmóticos após efracção do esmalte, evidenciaram respostas selectivas das fibras do grupo Aδ mielínico fino em fibras nervosas dissecadas dos nervos alveolares (Nähri, 1985; Nähri et al., 1982a). Dado que havia resposta neurofisiológica marcada escassos segundos após aplicação de calor intenso, sem que a elevação ou a baixa brusca de temperatura tivessem tempo de se transmitir à polpa, concluíu-se que ela se devia à excitação de filetes nervosos amielínicos provenientes de fibras Aδ da polpa, contidos nos túbulos dentinários.

Tal excitação parece ser operada pela activação hidrodinâmica do líquido intratubular. Estimulações de vários tipos mostraram-se efectivamente capazes de induzir correntes fluidas nos canais dentinários em modelos experimentais desenvolvidos *in vivo* e *in vitro* (Brännström, M., 1986; Horiuchi

e Matthews, 1973; Pashley, 1990). Em voluntários humanos, a estimulação da dentina semelhante à praticada nos animais de experiência causava dor fina, aguda e penetrante, típica da excitação das fibras Aδ. Importa recordar que a produção da dor característica da dentina geralmente requere decapagem do esmalte com abertura ao exterior dos túbulos dentinários, a fim de que o fluxo intratubular corra livremente (Pashley, 1990). Todavia, as alterações bruscas da temperatura em dentes intactos também originam respostas nas fibras Aδ, se bem que menos intensas, pelo que o fluxo hidrodinâmico poderá ocorrer mesmo na ausência de orifício tubular exterior patente. Alternativamente, talvez a excitação se deva à própria alteração da temperatura nos filetes nervosos intracanaliculares propagada através da dentina, sem intervenção do fluxo hidrodinâmico.

Pelo contrário, na estimulação mecânica nóxica directa da polpa exposta, as respostas electrofisiológicas ocorriam nas fibras amielínicas C dos nervos alveolares. Tal sucedia também no caso das respostas tardias ao aquecimento do dente intacto acima de 43,8°C, em que a subida de temperatura tinha tempo de se propagar por convecção à polpa (Nähri et al., 1982b). Em voluntários humanos, o calor provocava dor tardia contínua, pesada e irradiante (Hensel e Mann, 1956), semelhante à observada na clínica dos estados inflamatórios pulpares, característica da activação das fibras C.

Finalmente deve referir-se que algumas unidades nervosas, registadas nos nervos alveolares, acusaram velocidades de condução acima de 30 m/s após estimulação eléctrica de baixa intensidade, próprias das fibras sensitivas mielínicas grossas Aβ (McGrath et al., 1983). Receptores mecânicos intradentários de baixo limiar foram também confirmados mais recentemente (Dong et al., 1990, 1993). Todavia, trata-se de achados excepcionais que não podem infirmar a noção de que a quase totalidade da percepção sensitiva originada no dente é nociceptiva, levando à sensação dolorosa no sujeito consciente.

Outra faceta demonstrativa da natureza sómato-sensitiva da grande maioria da rede nervosa dentária reside no facto de se obterem respostas

electrofisiológicas à estimulação eléctrica da dentina ou da polpa no complexo trigeminal do tronco cerebral em qualquer animal de experiência (Dong et al., 1990; Hu e Sessle, 1984; Khayyat et al., 1975). Por outro lado, os métodos neuroanatómicos corroboraram estas conclusões posto que traçadores neuronais estáveis, injectados na polpa dos molares do rato, eram transportados a todo o complexo trigeminal (Marfurt e Turner, 1984).

Os enormes progressos verificados na detecção de proteínas ou peptídeos, enzimas e outros materiais biológicos, nos diferentes componentes dos nervos periféricos, e sua detecção por imunocoloração, têm levado a tentativas de identificação mais precisa dos tipos de fibras nervosas sensitivas. Assim, um grupo de proteínas que funcionam como ligandos do catião Ca^{2+} abundam, com algumas excepções, nos pericários grandes dos gânglios sensitivos raquidianos e do gânglio sensitivo do trigémeo ou gânglio semilunar, pericários esses, no primeiro caso, habitualmente dotados de axónios periféricos mielínicos que transportam excitações inócuas. Entre esses ligandos contam-se a proteína S-100 (Ichikawa et al., 1997), a parvalbumina e a calbindina (Ichikawa et al., 1995, 1996) que se localizam, as três, nos pericários grandes do gânglio semilunar. Imunorreactividade para a parvalbumina e a calbindina foram, por outro lado, demonstradas por estes autores nas fibras nervosas mielínicas da polpa.

Outros marcadores têm afinidades particulares. A proteína neuronal PGP 9.5 existe em todos os neurónios pulpares independentemente das suas características, ligada à periferina, uma proteína dos neurofilamentos (Luukko, 1997; Maeda et al., 1994). Recentemente, têm-se empregue imunocolorações para a proteína p38, ou sinaptofisina, que ocorre nas vesículas pequenas dos terminais sinápticos e de células neuro-endócrinas. Na polpa humana observaram-se numerosas varicosidades axonais imunorreactivas na polpa, frequentemente à volta de vasos (Casasco et al., 1990). Poderá tratar-se, no caso dos botões justavasculares, de terminais vasomotores autónomos. Uma situação semelhante ocorre na polpa humana com nervos e varicosidades imunorreactivas (IR) para o factor hipotalâmico inibidor da hormona do cres-

cimento, a somatostatina (Casasco et al., 1991) que tanto se sabe existir em nervos sensitivos como autónomos. A sua função seria a de inibir a libertação de substância P na polpa inflamada.

Particularmente importantes no caso da inervação dentária são os marcadores das fibras sensitivas periféricas finas, transportadoras típicas de excitações dolorosas no caso dos nervos aferentes à medula-espinal (Light e Perl, 1982). O grupo mais conhecido inclui taquininas dotadas de uma terminação carboxílica comum, entre elas as substâncias P (SP) e K, e um dos peptídeos codificados, além da calcitonina, pelo gene desta hormona tiroideia, ou seja o CGRP (peptídeo relacionado com o gene da calcitonina). A SP tem sido identificada nas fibras sensitivas somáticas amielínicas finas da pele e vísceras, assim como nas terminações centrais dos aferentes primários finos nas lâminas superficiais do corno dorsal da medula espinal e do núcleo espinal do trigémeo (Hökfelt et al., 1975; Ljungdahl et al., 1978). O CGRP ocorre no mesmo grupo neuronal, em colocalização com a SP (Gibbins et al., 1985; Gibson et al., 1985). Ambos desaparecem dos aferentes primários finos espinais em ratos injectados neonatalmente com o neurotóxico capsaicina (Gibbins et al., 1985) que destrói selectivamente os aferentes finos nociceptivos (Nagy et al., 1981). As imunocolorações para os dois peptídeos têm sido aplicadas ao dente para a demonstração da sua rede nervosa. O CGRP parece ser muito mais abundante nos nervos dentários (Silverman e Kruger, 1987) do que a SP (Wakisaka et al., 1984). Ambos os neuropeptídeos ocorrem nos nervos da polpa em feixes vásculo-nervosos na região apical e central ou em fibras isoladas. Fibras com os dois neuropeptídeos abundam no plexo de Raschkow, entre os odontoblastos e nos túbulos dentinários.

Dada a redução do CGRP pulpar pela aplicação subcutânea neonatal de capsaicina presume-se a sua ocorrência nas fibras amielínicas e mielínicas finas (Silverman e Kruger, 1987). Essa redução não é porém total, quer naquele modo de aplicação, quer utilizando doses sistémicas repetidas no rato adulto (Jacobsen e Heyeraas, 1996), talvez devido a uma irrigação sanguínea menos efectiva no dente do que noutros tecidos. Todavia, investigações re-

centes que utilizaram a introdução na polpa do canino do rato de concentrações elevadas de capsaicina, determinaram interrupção da condução electrofisiológica nas fibras C e Aδ no nervo alveolar, de acordo com a noção de que ambas são nociceptivas (Ikeda et al., 1997). Em conclusão, o conteúdo em SP, e principalmente em CGRP, parece ser um marcador seguro das fibras dentárias nociceptivas, amielínicas e mielínicas finas do dente (Luthman et al., 1992).

Finalmente, é de referir que os neuropeptídeos são libertados pelo topo distal das fibras sensitivas periféricas em resposta a traumatismos locais e inflamação (acção nocifensiva), exercendo nos tecidos efeitos inflamatórios, vasodilatadores e tróficos (Lembeck e Holzer, 1979; Payan e Goetzl, 1985; Pernow, 1985). A degenerescência dos nervos que contêm CGRP e SP no primeiro molar do rato após axotomia do nervo alveolar inferior, ou a sua destruição em maior ou menor grau pela capsaicina, determinaram, de facto, marcada baixa da dentinogénese no corno pulpar mesial e no pavimento da polpa central (Jacobsen e Heyeraas, 1996).

Inervação autónoma

Tem sido possível seguir o percurso de fibras pós-ganglionares *simpáticas* desde o gânglio cervical superior até ao gânglio semilunar, as quais se incorporam seguidamente no trigémeo até atingirem a polpa através dos nervos alveolares (Matthews e Robinson, 1980). Outros estudos mostraram a ocorrência de filetes nervosos na polpa humana que exibiam a bem conhecida fluorescência induzida por aldeídos característica dos neurónios que contêm catecolaminas (Pohto e Antila, 1968a), ou eram imunorreactivos a anticorpos contra a dopamina-beta-hidroxilase, uma enzima de síntese da noradrenalina (Uddman et al., 1984). Através da imunocoloração da tirosina-hidroxilase, outra enzima de síntese das catecolaminas, verificou-se que os

nervos simpáticos tendiam a situar-se à volta dos vasos sanguíneos pulpares (Casasco et al., 1995).

Por outro lado, imunocolorações duplas revelaram que nervos pulpares perivasculares apresentavam imunorreactividade para a dopamina-beta--hidroxilase e o neuropeptídeo Y (NPY) isolado do cérebro do porco (Uddman et al., 1984), ou para a tirosina hidroxilase e o NPY (Lundberg et al., 1982). Apenas uma escassa proporção de fibras imunorreactivas ocorria livre na polpa, separada dos vasos sanguíneos. No rato (Uddman et al., 1984), as fibras imunocoradas com anticorpos contra o NPY desapareciam após extirpação do gânglio cervical superior homolateral. O mesmo sucedia em animais injectados endovenosamente com o neurotóxico 6-hidroxidopamina (6-OHDA) que destrói os neurónios catecolaminérgicos.

A presença de catecolaminas no dente foi ainda corroborada por estudos cromatográficos que mostraram concentrações importantes de noradrenalina na polpa humana as quais eram nitidamente superiores às das aminas biológicas adrenalina e dopamina (Casasco et al., 1995). A distribuição de fibras terminais simpáticas demonstradas por qualquer um dos métodos citados ocorre principalmente na área central da polpa coronal e nos cornos pulpares. Na camada acelular ocorriam também junto dos odontoblastos (Avery et al., 1980). As fibras finas imunorreactivas ao NPY não foram vistas na dentina (Heyeraas et al., 1993).

A função vasomotora dos nervos noradrenérgicos foi amplamente demonstrada pela redução do fluxo sanguíneo e da pressão intrapulpar observada após estimulação eléctrica da cadeia simpática ou infusão intra-arterial de noradrenalina (Kim, 1990; Liu et al., 1990). Estudos farmacológicos destas acções vieram a revelar que tal se devia à vasoconstricção activada por receptores pós-juncionais do tipo α_1 existentes nas fibras musculares lisas dos vasos pulpares (Dörscher-Kim e Kim, 1990). A activação dos adrenoceptores α_2 e β tem também sido comprovada (Parker et al., 1999).

Os dados concernentes à existência de nervos *parassimpáticos* são menos consistentes. Fibras nervosas esparsas têm-se descrito na polpa coradas

histoquimicamente para a acetilcolinesterase (Pohto e Antilla, 1968b). Muitas destas fibras eram também vizinhas dos vasos sanguíneos intrapulpares. Dada a colocalização (Lundberg e Hökfelt, 1986), ocorrendo em muitos nervos de outros órgãos, entre acetilcolinesterase e imunorreactividade para o peptídeo intestinal vasoactivo (VIP), os nervos VIP da polpa têm sido considerados como fibras colinérgicas (Luthman et al., 1992). Seja como fôr, as fibras nervosas VIP não desaparecem dos dentes do felino após secção simpática (Wakisaka e Akai, 1989).

Fibras amielínicas foram observadas ao microscópio electrónico dotadas de varicosidades com predomínio de vesículas sinápticas claras e pequenas, apostas aos odontoblastos ou aos prolongamentos odontoblásticos em reentrâncias da respectiva membrana mas desprovidas de espessamentos sinápticos (Avery e Chiego Jr., 1990). Estes autores consideraram-nas como possivelmente colinérgicas. Outras varicosidades de outras fibras, na mesma localização, eram ricas em vesículas sinápticas densas, pelo que pertenceriam presumivelmente a fibras simpáticas. Aventaram então que os nervos autónomos pudessem exercer acções moduladoras da dentinogénese através destes dispositivos. Contudo nada impede de pensar que se trate de nervos sensitivos intracanaliculares, dado que as fibras sensitivas dispõem de dilatações semelhantes noutros tecidos, nomeadamente na bexiga (Gabella e Davis, 1998; Wakabayashi et al., 1993).

Projecções Sensitivas Bulbares

Dada a grande importância dos nervos sensitivos nociceptivos na inervação pulpar, importa examinar detidamente a projecção dos mesmos para o complexo trigeminal do tronco cerebral onde se processam as excitações dolorosas oriundas do dente.

Inúmeras investigações de natureza anatómica e fisiológica têm revelado projecções dos nervos dentários para todas as partes do vasto complexo nuclear do nervo trigémeo. Todavia, existe ainda ampla controvérsia sobre a terminação precisa das várias modalidades de sensação, dolorosa e inócua, nas diversas subdivisões do complexo. Quanto ao núcleo mesencefálico do trigémeo, não deve ser considerado nesta perspectiva, uma vez que representa uma peculiar transposição de células ganglionares sensitivas para o interior do eixo nervoso central (Paxinos e Watson, 1998), não sendo por conseguinte povoado por células sensitivas centrais de segunda ordem.

As investigações mais antigas, efectuadas com métodos de degenerescência após destruição pulpar no gato (Gobel e Binck, 1977; Westrum et al., 1976), mostraram grande predomínio de degenerescência axonal terminal nos dois subnúcleos mais caudais do núcleo espinal do trigémeo, ou seja nos subnúcleos interpolar e caudal. Os métodos hodológicos mais modernos e precisos, baseados no uso de traçadores estáveis, alargaram este leque de sítios de terminação.

Após injecção de peroxidase do rábano (HRP) na polpa de dentes das arcadas dentárias superior ou inferior do gato (Arvidsson e Gobel, 1981), apareceram numerosos aferentes marcados com o traçador acima e abaixo das zonas assinaladas pelo método da degenerescência. Acima, havia marcação ipsilateral notória no terço caudal do núcleo principal continuando-se caudalmente para o topo rostral do subnúcleo oral. Os dentes superiores e os inferiores estavam representados na parte dorsomedial do núcleo, e aí os superiores mais ventralmente e os inferiores mais dorsalmente. Fibras aferentes primárias mais grossas, de provável origem parental mielínica, penetravam nestes subnúcleos. Na parte inferior do feixe ou tracto espinal do trigémeo porém só viram fibras finas, de presumível origem amielínica, a entrar no subnúcleo caudal. A área de terminação no subnúcleo caudal ocupava as lâminas I, II e V, com a projecção maxilar sobretudo no terço dorso-intermédio dessas lâminas e a mandibular no terço dorsomedial. A marcação descia até ao segmento medular C1. Estas observações, relativas à terminação predomi-

nante dos aferentes finos no subnúcleo caudal, estavam de acordo com dados clínicos obtidos no homem (Sjökvist, 1938) demonstrando o efeito analgésico da secção do tracto trigeminal descendente (tractotomia descendente) ao nível do obex bulbar na nevralgia facial do trigémeo, uma vez que ele se destina em grande parte ao subnúcleo caudal. Um traçador mais aperfeiçoado, como a peroxidase de rábano associada a aglutinina do germe de trigo (WGA-HRP), usado com verificação da exclusão da sua drenagem apical para o periodonto no rato, confirmou, na generalidade, a extensão rostrocaudal das terminações, desde o núcleo principal até ao segmento medular C2 (Marfurt e Turner, 1984).

Os estudos fisiológicos têm, por outro lado, mostrado também que tanto os estímulos eléctricos faciais (não dentários) como dentários, nóxicos ou inócuos, determinam respostas electrofisiológicas ao longo de todo o complexo trigeminal do gato (Khayyat et al., 1975). No núcleo principal e no subnúcleo oral, e não só no subnúcleo caudal, recolheram-se respostas celulares à estimulação eléctrica, considerada nóxica, da polpa dos caninos do gato (Hu et al., 1981; Hu e Sessle 1984; Sessle e Greenwood, 1976).

No entanto, três dados científicos continuaram a sugerir uma posição privilegiada ao subnúcleo caudal no processamento do afluxo nociceptivo. Em primeiro lugar o facto de nele terminarem aferentes finos (Arvidsson e Gobel, 1981) que, na medula espinal, de há muito se sabia conduzirem o afluxo doloroso (Light e Perl, 1982). Depois, a semelhança da organização em lâminas do subnúcleo caudal com a do corno dorsal medular, em ambos havendo uma representação sensitiva nociceptiva predominante nas lâminas superficiais, de onde ter o primeiro sido denominado corno dorsal bulbar (Hu et al., 1981). Finalmente, o efeito analgésico da operação de Sjökvist.

No subnúcleo caudal, a estimulação eléctrica da polpa no rato, com intensidades que despertam dor se aplicadas ao homem, revelou respostas confinadas a neurónios situados na parte dorsomedial das lâminas I e IIo (Shigenaga et al., 1976). No gato porém havia também respostas nas camadas mais profundas (Hu et al., 1981). Todas as células activadas pelos estímulos eléctricos

nóxicos na polpa respondiam também a estímulos nóxicos e inócuos aplicados a várias regiões da face (Hu e Sessle, 1984).

Por outro lado, a analgesia obtida por tractotomia descendente nas nevralgias do trigémio não se verificava no mesmo grau em relação à dor dentária (Young, 1982). O mesmo acontecia no macaco (Young et al., 1981) e no gato (Vyklicky et al., 1977), com base na percepção da dor nestes animais avaliada por métodos comportamentais aversivos em resposta a estímulos eléctricos pulpares, antes e depois da tractotomia descendente. Contudo, um dado importante a favor da natureza específica do processamento da dor no subnúcleo caudal foi a observação de que os estímulos nóxicos *naturais*, tais como a aplicação de calor ao dente, com a temperatura da polpa elevada a 48-51°C, evocarem respostas electrofisiológicas nas células do subnúcleo caudal mas não do subnúcleo oral, ao passo que em ambos os subnúcleos se registavam respostas à estimulação eléctrica (Hu e Sessle, 1984).

Como conciliar tão grande número de achados a favor e contra a especificidade nociceptiva do subnúcleo caudal? Para Denny-Brown e Yanagisava (1973) a excitação de todos os subnúcleos seria necessária para causar propagação trigeminofugal supraliminar nóxica em direcção ao tálamo. A supressão de parte da excitação (no subnúcleo caudal) por tractotomia (operação de Sjökvist) não permitiria atingir esse limiar impedindo a transmissão trigeminofugal. Por outro lado, sabe-se há muito (Tiwari e King, 1974) que existe uma projecção ascendente do subnúcleo caudal para os núcleos rostrais e que o primeiro pode exercer acção hiperpolarizante sobre os aferentes primários que terminam nos segundos (Scibetta e King, 1969). Isto levou à formulação da hipótese de que os neurónios de segunda ordem no núcleo principal e no subnúcleo oral só emitiriam respostas electrofisiológicas acima de certa intensidade mínima se estimulados não só pelo afluxo primário directo mas também indirectamente pelo afluxo que atingia o subnúcleo caudal e daqui era transmitido cranialmente ao núcleo principal e subnúcleo oral, onde originava um prolongamento da actividade neuronal (Khayyat et al., 1975). Outros porém aduzem a possibilidade de as afluências do subnúcleo caudal

aos núcleos mais craniais poderem diminuir a excitabilidade dos aferentes primários via interneurónios locais, por um fenómeno de inibição pré-sináptica, baixando a eficácia da transmissão nociceptiva trigeminofugal a partir dos núcleos rostrais e realçando a que se opera a partir do subnúcleo caudal. Este poderia portanto exercer acção moduladora sobre a excitação dos núcleos rostrais, aumentando-a ou baixando-a (Khayyat et al., 1975).

Estudos ultrastruturais recentes com duplas colorações devidas a marcação com HRP acoplado à subunidade B da toxina da cólera (CTb) e a imunocoloração para o glutamato, mostraram que terminais duplamente marcados de origem pulpar constituem sinapses axodendríticas e axo-axónicas no subnúcleo caudal, provavelmente empenhadas na percepção consciente da sensação dolorosa (Clements et al., 1991).

Em conclusão, o local de processamento dos afluxos dolorosos pulpares no complexo trigeminal não está ainda totalmente esclarecido.

Projecções Ganglionares

Este aspecto prende-se, como já referimos, com o calibre das fibras nervosas sensitivas que nos nervos espinais está directamente relacionado com o tamanho dos corpos celulares ganglionares que lhes dão origem.

A marcação retrógrada das células ganglionares, obtida após injecções intrapulpares de HRP no rato ou no gato (Arvidsson, 1975), mostrou que no gânglio do trigémeo os neurónios cujos axónios inervam os dentes têm localização somatotópica específica. Além de os pericários correspondentes aos dentes maxilares se situarem genericamente na divisão oftálmico-maxilar do gânglio e os mandibulares na divisão mandibular, a cada dente parece corresponder uma localização determinada dentro dessas divisões. Quanto à citologia das células ganglionares, a marcação com o traçador flúor-ouro

mostrou que as células mais numerosas eram de tamanho médio ou grande, o que se conjugava mal com os dados obtidos dos gânglios raquidianos (Fried et al., 1989). Nestes os axónios periféricos finos de condução lenta e natureza nociceptiva são oriundos do contingente de células pequenas (Lee et al., 1986; Sugiura et al., 1988). Sendo a maioria dos nervos pulpares, como vimos, mielínicos finos e amielínicos, os respectivos pericários deveriam, por isso, ser também de pequena dimensão.

Duplas marcações com flúor-ouro e anticorpos contra peptídeos revelaram contudo que não só as células pequenas e de tamanho médio eram CGRP-imunorreactivas mas que também o eram algumas células grandes (Fried et al., 1989). Por outro lado, Sujimoto et al. (1990) encontraram na mesma espécie, mas com o traçador WGA-HRP, abundantes células médias e grandes, de neurónios que inervavam a polpa, coradas histoquimicamente (não imunorreactivas) para a anidrase carbónica que era porém abundante nos nervos amielínicos e mielínicos finos da polpa.

Sugimoto et al. (1990) aventaram, por isso, a hipótese de que a maior parte dos nervos da polpa eram de facto oriundos de nervos grossos que corriam no trigémeo e viriam a perder total ou parcialmente a mielina ao entrarem no forâmen apical. Todavia, esta interpretação foi infirmada pelo facto de registos electrofisiológicos de fibras do nervo alveolar inferior do gato, após estimulação eléctrica da polpa dos caninos, terem revelado conduções naquele nervo inferiores a 2,5 m/s, características das fibras amielínicas, em 80% das fibras estudadas, e superiores àquela velocidade, próprias de fibras Aδ, em 20% dos registos (Jyväsjärvi e Kniffki, 1989). As primeiras respondiam também a estímulos naturais intensos, tais como o calor irradiante à temperatura de 41,4±7°C e estímulos mecânicos. A correlação entre tamanho do pericário e diâmetro do respectivo axónio periférico parece assim não ser tão linear como nos gânglios raquidianos. Por isso, uma categorização coerente dos aferentes primários dentais, quanto à neuroquímica, dimensões e especificidades sensitivas dos neurónios ganglionares e respectivas fibras dentárias, não está ainda definitivamente resolvida.

Aspectos Patológicos e Experimentais

Na defesa da integridade do dente assumem grande relevo as reacções da inervação e do componente imunológico da polpa face às agressões externas. A inervação sensitiva é responsável pela sensibilidade dolorosa que se manifesta já na dentina através dos terminais intratubulares dos nervos pulpares, e que é fundamental no alarme doloroso que o dente emite ao mínimo distúrbio da integridade da dentina. Além disso, a rede nervosa sofre consideráveis remodelações face às agressões ao dente. As células do sistema imunitário têm a ver com o facto de ser na polpa que se desencadeiam os fenómenos de imunidade celular destinados à neutralização das agressões bacterianas. A reacção imunológica está porém intimamente relacionada com a nervosa, como veremos adiante.

A imensa maioria das lesões dentárias provém das agressões oriundas do meio intrabucal que têm como máxima expressão a cárie. A cárie mobiliza praticamente todos os recursos defensivos sediados na polpa e constitui o modelo principal da patologia do dente. Presta-se, além disso, ao desenvolvimento de paradigmas no animal de experiência conducentes ao aprofundamento do conhecimento de alguns fenómenos citológicos e moleculares que ocorrem na prática clínica. Nesta parte do nosso trabalho, daremos particular realce às repercussões da cárie sobre a rede nervosa pulpar.

Cárie

Trata-se de uma afecção de causa bacteriana. Em condições de higiene bucal deficiente, na superfície dentária, principalmente nos sulcos da face oclusal e na zona de transição do esmalte para o cimento, tendem a acumular-se detritos alimentares onde proliferam germes bacterianos. Constitui-se desta forma a chamada placa bacteriana em que predominam microorganismos anaeróbios, principalmente as bactérias da espécie *Bacteroides*

(Kettering e Torabinejad, 1994), o *Streptococus mutans*, bacilos lácticos e o *Actinomices* (Seltzer e Bender, 1990), que a partir da sacarose e outros glúcidos (Newbrun, 1982) produzem abundante ácido láctico (Kuboki et al., 1983). Este parece provocar a desmineralização ou dissolução dos cristais de hidroxiapatite no esmalte e dentina subjacente e a degradação da matéria orgânica por activação das proteases e colagenases locais. A difusão dos produtos elaborados pelos microorganismos é o principal responsável por estas lesões, razão pela qual pode haver destruição sem a presença de bactérias nas regiões mais profundas da dentina. O ataque polariza-se nos túbulos dentinários pela maior facilidade local de propagação e talvez por que o fluido dentinário oriundo da polpa seja um bom nutriente bacteriano (Brown e Lefkowitz, 1966). Os prolongamentos intratubulares dos odontoblastos reagem com neoformação de dentina mineralizada à volta dos túbulos dentinários, pelo que estes na parte mais profunda se apresentam rodeados de cristais irregulares e com as paredes espessadas por esclerose devida a colagéneo neoformado.

Se o processo destrutivo prosseguir lentamente, a actividade reaccional dos odontoblastos manifesta-se ainda através da deposição em placa de nova dentina por baixo da dentina pré-existente que está a ser atacada pelas toxinas bacterianas a partir da cárie. Trata-se da chamada dentina reparadora, que pode surgir quando a cárie escavou já meia espessura da dentina, e que apresenta estrutura tubular mais irregular do que a da dentina original (Seltzer e Bender, 1990). Pode haver também destruição mais ou menos extensa dos odontoblastos com formação de dentina reparadora por parte dos odontoblastos remanescentes ou talvez de pulpócitos metaplasiados em odontoblastos (Magloire et al., 1992).

Porém se o processo destrutivo fôr rápido, ocorrem também fenómenos inflamatórios na polpa antes de a cavidade provocada pela cárie a atingir, mesmo na ausência de bactérias na polpa. Além disso, surgem imunoglobulinas e outros produtos imunitários nos odontoblastos e nos pulpócitos vizinhos. Quando a cavidade expõe a polpa, estabelece-se um quadro inflamatório

mais intenso. Em qualquer dos casos, o infiltrado inflamatório compõe-se de neutrófilos, macrófagos, plasmócitos e linfócitos oriundos de vasos hiperemiados, e pode dar origem à eclosão de uma pulpite aguda rapidamente generalizada e eventualmente seguida de abcesso dentário. Na periferia do abcesso, o tecido de granulação é reforçado por pulpócitos cuja actividade formadora de colagéneo pode conduzir ao aparecimento de uma capa esclerótica isoladora. Em certas cavidades grandes não tratadas, toda a polpa é gradualmente invadida por pulpite aguda que desde logo se torna crónica e se pode transformar em necrótica por coagulação e liquefacção do conteúdo.

Um aspecto muito interessante é o da proliferação de células de reacção imunitária na polpa. Tal facto afecta especialmente as células apresentadoras de antigénios que englobam as células reticulares dendríticas dos órgãos linfóides, nomeadamente gânglios linfáticos, as células de Langherans da epiderme e os macrófagos em geral (Roitt et al., 1985). As células apresentadoras de antigénios definem-se como portadoras dos antigénios glicoproteicos codificados pelos genes do complexo principal de histocompatibilidade, designado HLA II no homem e HMC II no rato. Tais antigénios associam-se na membrana da célula a antigénios de origem bacteriana e o complexo resultante é reconhecido pelos linfócitos T auxiliares ou "helper" (H) e por eles destruído através das suas linfocinas.

As células apresentadoras de antigénios aparecem no rato em número superior ao da sua ocorrência no dente normal na zona subjacente às cavidades experimentais efectuadas na dentina, já às 6 horas, com eventual penetração dos túbulos dentinários (Ohshima et al., 1995). No dente humano cariado verificou-se fenómeno semelhante com respeito às células dendríticas imunocoradas para os antigénios do complexo HLA II (Izumi et al., 1996).

Tudo leva a crer, como dissemos, que os antigénios bacterianos libertados pelas bactérias envolvidas na cárie possam atingir a polpa por difusão através dos túbulos dentinários quando a cárie é ainda superficial. As células apresentadoras de antigénios, depois de fagocitar e incorporar os antigénios na membrana, poderão dirigir-se aos gânglios linfáticos para os apre-

sentar aos linfócitos T auxiliares, atraindo depois estes à polpa. Curiosamente, têm-se identificado nas mesmas regiões pulpares não só numerosas células imunocoradas para o HLA-DR mas também para a α-antiquimotripsina, o que sugere um papel na defesa imunológica contra as proteases libertadas e activadas pelos neutrófilos (Izumi et al., 1996).

Particularmente interessantes são os efeitos da cárie sobre a *inervação* dentária se bem que tais efeitos tenham sido bem estudados no modelo experimental da cavitação mais do que na cárie espontânea. Em cavidades superficiais em V praticadas na dentina do rato, observou-se aumento de fibras imunocoradas para o CGRP na polpa, antecedendo e acompanhando a formação de dentina reparadora (Taylor e Byers, 1990). Pelo contrário, a rede de fibras com NPY, presumivelmente noradrenérgicas, não aumentava de densidade (Oswald e Byers, 1993). Um facto digno de nota é que ao contrário de outros tecidos em que quer as fibras sensitivas quer as simpáticas possuem receptores para o factor de crescimento nervoso (NGF), no dente isso acontece apenas nas primeiras (Fried e Risling, 1991). A síntese de NGF, demonstrada por hibridização do respectivo RNA, surge nos pulpócitos dos dentes com cavidades experimentais logo no início da lesão. A actuação do NGF sobre as fibras sensitivas mediaria o rebentamento (*sprouting*) dos seus ramos (Byers et al., 1992b). A emissão de rebentos ou brotos nervosos pode ter ainda uma causa adicional. Experiências de colocação de metabolitos bacterianos em cavidades dentárias experimentais têm mostrado que a amónia, a ureia, o indol e a arginina deles derivadas estimulam a proliferação nervosa intrapulpar. Desta forma, a excitação da rede sensitiva na polpa para-odontoblástica subjacente às áreas cavitadas poderia ser despertada pelos produtos que difundem para a polpa através dos túbulos dentinários, mesmo antes de haver inflamação local (Panopoulos, 1992). Consequentemente, o rebentamento nervoso é reversível, desaparecendo ao fim de algumas semanas se a cavidade experimental fôr preenchida (Taylor et al., 1988).

É bem conhecido o fenómeno denominado reacção flamejante (*flare reaction*) na derme. A injecção de um irritante local, como a capsaicina, dá

origem a uma zona ruborizada brilhante que resultou da libertação de substância P pelos colaterais dos nervos que inervavam a zona irritada. Esta libertação tem sido atribuída a impulsos antidrómicos desencadeados nesses colaterais. Isto tem servido para explicar o aumento de neuropeptídeos algogénicos em zonas inflamadas dos tecidos (Jancsó et al., 1968; Lembeck, 1983), uma acção denominada nocifensiva (Silverman e Kruger, 1987). Aos neuropeptídeos libertados a partir dos nervos sensitivos tem sido ainda atribuídas funções vasodilatadoras e cicatrizantes. Sabe-se que o CGRP actua sobre as células endoteliais dos vasos pulpares aumentando a produção de um factor relaxante da musculatura arterial lisa com vasodilatação subsequente (Heyeras e Kvinnsland, 1992).

Deve notar-se que muitas cáries exibem escassa dor espontânea pelo facto de os detritos alimentares e bacterianos, que nelas ocorrem em maior ou menor grau, obstruírem os túbulos dentinários, impedindo o fluxo hidrodinâmico. No entanto, o contacto com líquidos quentes ou frios origina, como vimos, dor por convecção térmica em direcção à polpa, que muitas vezes se manifesta de forma surda e persistente. Os detritos existentes na cavidade da cárie podem também causar dor por desencadearem correntes osmóticas nos túbulos a despeito dos rolhões obturantes periféricos que possam ostentar (Panopoulos, 1992).

Por outro lado, as reacções da polpa às alterações térmicas são factos a considerar no estudo da cárie. O calor por si só aumenta o processo inflamatório pulpar de onde a necessidade absoluta de o evitar pela refrigeração das brocas com um jacto de água (Selzer e Bender, 1990). Por outro lado, a irritação produzida pela brocagem mecânica da dentina a curta distância da polpa tem efeito directo sobre as fibras nervosas C desta que emitem uma quantidade crescente de neuropeptídeos (Byers et al., 1992a; Gazelius et al., 1981). Se estes são vasodilatadores, podem agravar imediatamente a inflamação, embora mais tarde possam incrementar a cicatrização.

Em resumo, a agressão bacteriana proveniente da cárie provoca inflamação pulpar com reacção imunológica local e possivelmente proliferação

dos nervos sensitivos. Este fenómeno dever-se-á principalmente à estimulação prévia da produção de NGF nas células pulpares. A libertação de neuropeptídeos pelo topo periférico dos nervos agrava a inflamação mas acaba por ter um efeito cicatrizante devido à vasodilatação que provoca.

Muito recentemente reportou-se o aparecimento de um aumento sincrónico dos nervos sensitivos e das células imunocoradas para o antigénio HLA-DR na polpa por debaixo das cáries superficiais e profundas (Sakurai et al., 1999). Nestas, porém, tanto as células como as fibras não penetravam a ponte de dentina reparadora calcificada mas apenas a não-calcificada. Estes dados sugerem a existência de uma interacção neuro-imunitária na defesa antibacteriana do dente, que desenvolveremos mais detalhadamente adiante.

Outras agressões

Se a cárie se origina numa agressão bacteriana com repercussão pulpar imediata, muitas agressões traumáticas ou químicas podem acarretar também lesões pulpares. No desgaste mecânico das faces oclusais do dente com destruição do esmalte e/ou dentina, devido a bruxismo, mastigação exagerada, ou preensão crónica de objectos duros como boquilhas de cigarro ou cachimbo, a exposição dos túbulos dentinários, a perturbação do fluxo hidrostático e a irritação dos prolongamentos odontoblásticos, acarretam a formação de dentina reparadora que protege as zonas traumatizadas (Shafer et al., 1987). Tal sucede igualmente nas raras erosões químicas como sucede na acidez exagerada da saliva ou quando ocorre contacto com ácido clorídrico de origem gástrica nos vómitos da anorexia nervosa. Nestes casos, os ácidos descalcificam os invólucros dentários. Nestas agressões não bacterianas também ocorre a esclerose e a calcificação dos túbulos dentinários, assinaladas a propósito da cárie. As reacções neurais e inflamatórias da polpa nestas situações clinicamente pouco comuns, não têm porém sido objecto de estudo. Apenas nas agressões de maior intensidade, tais como fracturas dentárias

traumáticas ou o aquecimento exagerado pelas brocas (actualmente inexistente com o equipamento moderno dotado de refrigeração líquida), se assinalaram quadros de inflamação pulpar por vezes exacerbados até à pulpite aguda e crónica, e à necrose pulpar.

De facto, as reacções finas do tecido pulpar às agressões físicas e químicas, têm sido sobretudo analisadas em modelos experimentais. A chamada oclusão traumática, por elevação de 1 mm da superfície oclusal do primeiro molar do rato com material compósito, dá origem a uma estimulação mecânica crónica que induz proliferação dos nervos pulpares e periodontais (Kvinnsland e Heyeraas, 1992). Aos 5 dias há já nítido aumento da rede de fibras CGRP-IR que sobe até aos 30 dias de forma mais marcada na polpa do que no periodonto. Também a movimentação forçada contínua do dente no rato causa um efeito semelhante (Kvinnsland e Kvinnsland, 1990). Quanto ao mecanismo da estimulação da proliferação nervosa, ele é ainda altamente enigmático. Todavia, estudos farmacológicos recentes envolvendo superfusão da polpa dentária do bovino com agonistas dos receptores de aminoácidos excitatórios (EAA) mostraram que o receptor glutamatérgico AMPA e o cainato provocam libertação intrapulpar de CGRP (Jackson e Hargreaves, 1999). É possível que a activação daqueles receptores pela estimulação física ou química da superfície dentária seja em parte responsável pela resposta neurogénica observada.

Polpa e periodonto

O comprometimento pulpar na doença periodontal é relativamente frequente e geralmente explicado pela existência de comunicações entre o ligamento periodontal e a polpa através do forâmen apical e dos canais laterais acessórios (Seltzer e Bender, 1990). Dois tipos de lesão pulpar ocorrem na periodontose. O primeiro é a *atrofia* pulpar com rarefacção de pulpócitos, quer nas câmaras pulpares quer na raíz, esclerose por aumento do colagéneo

e deposições focais de cálcio. A causa principal parece ser a diminuição da irrigação arterial devida à compressão das artérias nos canais laterais e no canal radicular cujo calibre pode estar estreitado por deposição de dentina reparadora. Embora o estado da inervação esteja mal estudado, em 50% dos dentes com polpa atrófica de causa periodontal a sensibilidade dolorosa parece estar alterada, com a ocorrência de dor espontânea, frequentemente agravada pelo frio, ou analgesia total (Seltzer e Bender, 1990).

Outra repercussão pulpar da lesão periodontal é a *inflamação* devida à infecção propagada através dos canais. Neste caso há geralmente uma pulpite crónica com predomínio de linfócitos, ou necrose pulpar com mineralização cálcica distrófica. O factor infeccioso é predominante, grandemente facilitado pelo desnudamento da raíz que expõe os canais laterais aos microrganismos existentes na boca. Há habitualmente reacção exagerada aos estímulos térmicos, mas tem também sido observada analgesia quando a polpa se encontra totalmente afectada pela inflamação crónica, ou necrosada (Seltzer e Bender, 1990).

Considerando o aumento da mobilidade associado à periodontose, seria de esperar também um aumento da inervação a exemplo do que sucede na movimentação forçada do dente no rato (Kvinnsland e Kvinnsland, 1990). O tema não foi porém até agora abordado, tanto quanto sabemos.

Perspectivas do Trabalho

A despeito dos conhecimentos acumulados nos últimos 50 anos, que acabámos de rever, sobre a anátomo-fisiologia da polpa e sua inervação, certos aspectos permanecem ainda mal definidos.

Assim no concernente à organização do estroma pulpar, foi, como vimos, aventada a possibilidade de, em situações patológicas, ocorrer metaplasia dos pulpócitos da camada celular em odontoblastos formadores de dentina reparadora. Contudo tem sido dada escassa ênfase ao problema de

saber se as células daquela camada possuem estrutura distinta da dos restantes pulpócitos livres, porventura mais próxima da dos odontoblastos. Por outro lado, embora os estudos bioquímicos tenham mostrado o predomínio na polpa do colagéneo III próprio da reticulina, estudos histológicos sobre a importância relativa das fibras colagéneas e de reticulina no estroma pulpar não têm sido efectuados de maneira sistemática. A presença dos vários tipos de fibras do sistema elástico no estroma pulpar não está também convenientemente resolvida. Finalmente, a localização de células imunitárias na polpa normal e as variações dependentes dos diversos estados patológicos, são aspectos susceptíveis de maior aprofundamento.

No relativo ao tema específico deste trabalho, a Inervação, há numerosos pontos dignos de atenção. É notório que as fibras nervosas da polpa correm inicialmente associadas a vasos sanguíneos em feixes vásculo-nervosos. Todavia, a organização histológica dos feixes vásculo-nervosos não foi analisada em pormenor, nomeadamente quanto à ocorrência do perineuro. Quanto à inervação do dente, os numerosos dados existentes referem-se à ocorrência das fibras nervosas mielínicas grossas e finas, e amielínicas, estudadas com microscopia electrónica. Não se efectuou, porém uma comparação sistemática entre a distribuição intrapulpar das fibras sensitivas mielínicas e amielínicas, assinaladas pelos seus marcadores específicos. Embora se saiba muito sobre as respostas electrofisiológicas dessas populações aos diferentes estímulos nóxicos, falta destrinçar o efeito do calor intenso na estrutura histológica da polpa e na proliferação das fibras nervosas.

Um tema particularmente difícil é o da existência e função das fibras mielínicas grossas na polpa, em face da sensibilidade quase exclusivamente dolorosa do dente. Intimamente relacionado com este facto é o problema dos locais de terminação das fibras sensitivas do dente no núcleo sensitivo do trigémeo. Os dados puramente neuro-anatómicos, hodológicos, apontam para uma projecção dos nervos pulpares para todas as subdivisões do núcleo que seriam todas receptoras do afluxo nociceptivo. Elementos clínicos e neurofisiológicos, porém, em particular o facto de as estimulações nóxicas

naturais (térmicas) só produzirem respostas electrofisiológicas no subnúcleo caudal, apoiam a hipótese de a projecção dolorosa ter este destino selectivo.

Um ponto relacionado com o anterior diz respeito às projecções para o gânglio sensitivo do trigémeo (gânglio semilunar). Se a grande maioria das fibras sensitivas pulpares são amielínicas (C) e mielínicas finas (Aδ) nociceptivas compreende-se mal que uma grande parte das células ganglionares marcadas por traçadores introduzidos na polpa sejam "grandes", supostamente dotadas de axónios mielínicos grossos como sucede no território somático dos gânglios raquidianos.

A reacção dos nervos pulpares às agressões bacterianas e físico-químicas tem despertado interesse crescente nos últimos anos. Muitas interrogações subsistem contudo. A reacção inflamatória da polpa à cárie acompanha-se sempre de alterações da rede nervosa sensitiva? Efectivamente a proliferação nervosa tem sido amplamente estudada sobretudo em modelos de cavitação experimental no animal de experiência que embora semelhantes anatomicamente à cárie, pressupõem uma patogénese muito diferente.

Finalmente, dado que a doença periodontal se manifesta com dor ou pelo contrário com analgesia e o dente sofre um excesso de mobilidade, desconhecem-se todavia os efeitos desta situação patológica sobre a rede nervosa dentária.

Em face destas questões, decidimos no presente trabalho investigar alguns dos pontos mais controversos.

1. Em primeiro lugar, efectuámos um exame preliminar da estrutura histológica e ultrastrutural do tecido conjuntivo da polpa. Em especial, averiguámos a citologia dos pulpócitos e outras células pulpares e a distribuição das fibras colagéneas, reticulares e do sistema elástico no estroma pulpar.

2. No relativo à inervação dentária normal, procedemos a uma observação sistemática da rede nervosa pulpar. Para microscopia óptica, utilizámos principalmente a imunocoloração para a proteína S-100 cuja ocorrência exclusiva nas células ganglionares grandes faz supôr uma presença específica nas

fibras mielínicas do dente, o CGRP e a SP a fim de descortinarmos a topografia dos nervos sensitivos amielínicos e mielínicos finos, o NPY e o VIP para os nervos autónomos. Simultaneamente estudámos a distribuição e o calibre das fibras mielínicas e amielínicas em microscopia electrónica. A projecção dos aferentes sensitivos dolorosos para os diferentes núcleos e subnúcleos do complexo trigeminal do tronco cerebral foi abordada no rato por meio da activação do protooncogene c-*fos* após estimulação dolorosa do dente. Ainda no domínio da organização normal da inervação, estudámos o tipo de células sensitivas que no gânglio semilunar enviam axónios para a polpa, utilizando um traçador neuronal e imunocolorações para os neuropeptídeos CGRP e SP.

3. Em seguida examinámos a reacção dos nervos da polpa às modalidades mais frequentes de agressão patológica. Dentes humanos com cáries de diferente grau e profundidade, assim como dentes afectados por periodontose, com ou sem sensibilidade dolorosa, foram examinados quanto ao estado do estroma pulpar e às alterações da inervação sensitiva, recorrendo principalmente à imunocoloração para o CGRP.

4. Finalmente, produzimos agressões ao primeiro molar do rato, quer através da execução de cavidades na dentina com e sem exposição pulpar, quer pela aplicação de calor intenso ao dente intacto. A cronologia das lesões da polpa e das modificações da rede nervosa imunorreactiva à CGRP foi seguida até aos 20 dias pós-estimulação. As modificações da distribuição das células apresentadoras de antigénio foram identicamente acompanhadas ao longo do período.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material Humano

Todos os dentes foram obtidos de pacientes adultos de ambos os sexos com idades entre os 24 e os 60 anos. A maior parte dos dentes sãos eram terceiros molares de erupção difícil ou outros dentes retidos na arcada dentária. Os dentes lesados eram portadores de cáries profundas, acompanhadas ou não de dor espontânea, que se tornou necessário extrair por indicação clínica. Foram também extraídos alguns dentes de mobilidade exagerada devido a periodontose. Nuns casos a polpa foi destacada e fixada, enquanto noutros o dente intacto era fixado e descalcificado (para detalhes numéricos, ver quadro 1).

Dentes não descalcificados

Efectuámos duas fissuras longitudinais dos invólucros calcificados até às imediações da polpa, com o auxílio de uma broca cilíndrica de alta velocidade, refrigerada a água. Após fractura do dente, com cinzel e martelo, em duas metades, retirou-se a polpa aderente a uma delas com um pequeno escalpelo, a qual foi imersa no fixador histológico (Fig. 1). Geralmente separavam-se alguns fragmentos da polpa coronal e da polpa apical, de volume exíguo se destinados a estudo em microscopia electrónica (ME), maiores se destinados ao estudo em microscopia de luz (ML). Estes fragmentos mais volumosos foram fixados em líquido de Bouin à temperatura ambiente e incluídos em parafina, ou em paraformaldeído a 4% em tampão fosfato, pH 7,4, durante 3 horas a 4°C , a que se seguiu lavagem em tampão com sacarose, corte a 30 µm no micrótomo de congelação e armazenamento dos cortes em solução crio-protectora (Lu e Haber, 1982).

Os cortes de parafina, de 7 µm de espessura, serviram para diversas colorações histológicas e histoquímicas, e para algumas colorações imunoci-

toquímicas. Entre as primeiras, utilizámos a hemateína-eosina, a picrofucsina de Van Gieson para a demonstração do colagéneo, o tricómico de Masson, a hematoxilina fosfotúngstica de Mallory, a orceína ácida para as fibras elásticas, as colorações argênticas de Sweet e Laidlaw para as fibras de reticulina, a impregnação argêntica de Llombart na variante de Jabonero destinada a evidenciar as fibras nervosas amielínicas mas que cora também os fibroblastos, e finalmente o ácido periódico-Schiff (PAS) para o glicogénio e as glicoproteínas em geral, que igualmente desenha as membranas basais. Os métodos histológicos foram executados de acordo com as indicações contidas no manual técnico de Lillie (1965). Os métodos imunocitoquímicos serviram para identificar os linfócitos B e T. Cortes desparafinados foram sucessivamente incubados num soluto com anticorpo monoclonal CD20cy anti-células B, ou com anticorpo monoclonal CD45RO anti-células T. Os dois anticorpos produzidos no ratinho eram de proveniência Dakopatts (Glostrup, Dinamarca). Seguiu-se incubação em soluto com anticorpo secundário biotinilado anti-ratinho obtido do coelho (Dakopatts) e complexo avidina-biotina-HRP (ABC) de proveniência Vector Elite (Burlingham, CA, EUA). Finalmente a reacção imunológica foi revelada com uma mistura de tetracloreto de diaminobenzidina (DAB) e água oxigenada a 30%. Em cortes de parafina procedeu-se ainda à imunocoloração da proteína S-100. O método utilizado foi também o ABC com anticorpo primário anti-S-100 produzido no coelho e anticorpo secundário obtido do porco (Dakopatts). Nas imunocolorações fez-se inibição da peroxidase endógena com água oxigenada e metanol antes da imersão na solução com anticorpo primário. Os controlos foram cortes incubados na ausência de anticorpo primário.

Os cortes de congelação do mesmo material conservados em solução crio-protectora serviram para imunocorar as fibras nervosas para a proteína S-100 e os peptídeos CGRP, SP, NPY e VIP. A sequência técnica foi também a do método ABC. Cortes livres flutuantes foram tratados com água oxigenada para inibição da peroxidase endógena, incubados em soluto com anticorpo primário durante a noite, anticorpo secundário biotinilado durante 1 hora,

e ABC, a que se seguiu revelação por DAB e água oxigenada. Os cortes montaram-se em lâminas gelatinadas com Eukitt. Os controlos foram efectuados sem o anticorpo primário. Os anticorpos primários eram policlonais, contra CGRP de origem Amersham International (RU) obtido do coelho, contra SP, NPY e VIP de origem Peninsula (Belmont, CA, EUA), o último produzido no bode, os dois primeiros no coelho. Para a proteína S-100 utilizou-se a mesma sequência técnica usada nos cortes de parafina.

As peças destinadas a exame ultrastrutural foram mergulhadas na mistura de glutaraldeído a 25% e paraformaldeído a 4% em tampão fosfato de Karnovsky durante 2 horas. Nos dentes normais os fragmentos provinham da coroa pulpar e da região apical, nos dentes cariados da polpa subjacente à cárie, nos periodontósicos todos os fragmentos provinham da zona do colo. Após lavagem em tampão fosfato, os fragmentos passavam por tetróxido de ósmio a 1%, eram desidratados e incluídos em epon. Cortes semifinos (1 μm) e ultrafinos foram efectuados no ultramicrótomo LKB 5 e corados por citrato de chumbo e acetato de uranilo. Em dois dentes terceiros molares normais, as peças foram inicialmente fixadas numa mistura de ácido tânico a 0,25% e glutaraldeído a 4% em tampão de Millonig, pH 7,4, a fim de melhorar a coloração das fibras elásticas (Cotta Pereira et al., 1978).

Quadro 1 — Dentes Humanos

	Molares			*Incisivos/caninos*
	Normais	Cárie	Periodontose	Periodontose
N/descalcificados	13	8	4	8
Descalcificados	8	6	—	—

Dentes descalcificados

Alguns dentes foram objecto de fixação directa da polpa *in situ* (Quadro

1). Escavou-se um pequeno orifício na superfície oclusal dentária com broca esférica fina até se atingir a polpa. Com uma seringa de Hamilton injectou-se através do orifício cerca de 0,5 ml de paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4. Após imersão de 4 horas no mesmo fixador, os dentes passaram aos solutos desmineralizantes, a saber ácido fórmico a 4% durante cerca de 6 meses ou EDTA a 14% durante 8 meses. Constatada a completa descalcificação pela possibilidade de seccionar o dente com uma lâmina de barbear, efectuaram-se cortes de 30 µm no micrótomo de congelação. Cortes flutuantes foram então imunocorados com os antissoros contra S-100, CGRP, SP, NPY e VIP, indicados acima. Seguiu-se a revelação pelo ABC-HRP e o cromagéneo DAB.

Outros dentes foram fixados em líquido de Bouin e, após descalcificação, incluídos em parafina. Cortes de 7 µm de espessura foram corados, como no caso das polpas isoladas, em hemateína-eosina, picrofucsina de Van Gieson, hematoxilina fosfotúnstica de Mallory, orceína ácida, métodos argênticos de Sweet e Laidlaw, e PAS.

Material Experimental

Técnicas gerais

O estudo incidiu principalmente nos primeiros molares superior e inferior, e em menor escala no segundo e terceiro molares de ratos adultos machos, pesando cerca de 200 grs. As experiências centraram-se na investigação das alterações da inervação dentária, embora o exame histológico geral da polpa também se efectuasse em alguns animais. Os ratos foram anestesiados com hidrato de cloral intraperitoneal a 35% na dose de 1 ml por Kg de peso corporal. A fixação foi efectuada por perfusão da aorta ascen-

dente com 0,5 l de tampão fosfato, 0,1 M, pH 7,4, seguido de 1 l de paraformaldeído diluído a 4% no mesmo tampão. De acordo com a finalidade da experiência retiraram-se então quer as arcadas dentárias, quer o tronco cerebral, quer o gânglio semilunar. No primeiro caso, em que se pretendia estudar o dente, separavam-se as duas hemi-mandíbulas e os hemi-maxilares. As quatro peças eram mergulhadas no fixador durante 4 horas a 4°C. Após lavagem em tampão fosfato, passavam-se às soluções descalcificantes, EDTA a 14% durante 8 semanas ou ácido fórmico a 4% durante 4 semanas. Estas soluções desmineralizantes eram mudadas diariamente.

Cortes verticais seriados do dente e respectivo encaixe ósseo efectuaram-se no micrótomo de congelação à espessura de 30 µm. Seleccionaram-se à lupa os cortes que incluíam a polpa dentária, os quais se armazenavam na solução crio-protectora de Lu e Haber (1992), de tal forma que posteriormente pudessem ser corados, em conjunto, cortes de controlos intactos e de ratos sujeitos a tratamento experimental. Os cortes livres flutuantes foram imunocorados com os antissoros policlonais enumerados acima contra CGRP, SP, NPY, VIP ou S-100. As reacções foram reveladas pelo método ABC e o DAB utilizado como cromagéneo.

Cortes de congelação de 10 µm de espessura dos mesmos dentes foram cortados num criostato Leitz e colados em lâminas histológicas gelatinadas. Imunocolorações contra o antigénio 1-A do rato presente em células dendríticas efectuaram-se com o anticorpo monoclonal OX6, obtido do ratinho, de origem Serotec (Oxford, RU) e anticorpo secundário biotinilado anti-ratinho obtido do rato (Vector) A revelação foi também efectuada através do ABC com o cromagéneo DAB. Alguns cortes foram contrastados pela hemateína.

Alguns ratos normais destinados a exame no ME foram perfundidos com a mistura aldeídica de Karnovsky, e os molares subsequentemente descalcificados. Pequeníssimos fragmentos dentários, uns contendo polpa coronal, outros polpa apical, foram osmificados e incluídos em Epon. Os cortes ultrafinos foram corados como indicado acima.

Experiências efectuadas

Os animais submetidos a tratamento experimental enumeram-se no quadro 2.

1. *Aplicação de calor nóxico*

A ponta esférica de 1 mm de diâmetro, de um instrumento de aço inoxidável para brunir a amálgama de prata (modelo DED, Aesculap, Tuttlingen, Alemanha) foi aquecida ao rubro durante 30 segundos na chama de uma lamparina de álcool, e pousada por três vezes na face oclusal do primeiro molar superior de ratos anestesiados, durante 10 segundos com 1 minuto de intervalo entre cada aplicação. A temperatura na dentina medida com um termo-condutor introduzido num orifício superficial executado na face dentária labial foi de cerca de 48°C. Na polpa, a temperatura lida após introdução do termo-condutor num orifício profundo, foi de cerca de 46°C. Estas temperaturas eram de cerca de 33,5°C nas duas localizações no molar de animais intactos. A mesma estimulação aplicada ao experimentador revelou-se dolorosa. Além disso, utilizaram-se controlos térmicos inócuos em que a ponta do instrumento ao rubro foi colocada na superfície dental descrita acima apenas durante 3 segundos. As temperaturas medidas na polpa e dentina foram de cerca de 35,5° e 38°C, respectivamente, e esta operação não era dolorosa quando aplicada ao primeiro molar do experimentador.

A fim de se produzirem estímulos mecânicos, nuns casos efectuou-se um orifício muito superficial na face oclusal do dente (estímulo inócuo) e noutros um orificio mais profundo que atingia a polpa de acordo com a gotícula rubra que surgia (estímulo nóxico). Introduziu-se neste caso um explorador fino de 0,5 mm de diâmetro (DA 411, Aesculap) na polpa por 3 vezes a intervalos de 1 minuto.

Quadro 2 — Material experimental (nº de animais)

Animais	*Imunocolorações*	*C-fos bulbar*
Controlos normais	14	10
Estimulação térmica nóxica	12	05
Estimulação térmica inócua	-	05
Estimulação mecânica pulpar	-	05
Estimulação mecânica superficial	-	05
Cavidades artificiais	12	-
Marcação do gânglio semilunar	08	-

A estimulação térmica destinou-se a: (A) Verificar o efeito do calor nóxico sobre a estrutura e inervação da polpa, e (B) Averiguar a localização da expressão do protooncogene c-*fos*, causada pelo estímulo nóxico, nas células sensitivas do complexo trigeminal do bolbo, com vista a determinar os locais de projecção sensitiva dolorosa nas diversas partes daquele complexo. A estimulação mecânica destinou-se apenas a estudar o efeito B.

A. Efeitos na inervação pulpar. Animais cujos dentes foram submetidos ao estímulo térmico nóxico, foram fixados por perfusão 2, 3 e 4 horas, 2, 4, 7, 12 e 20 dias após a aplicação dos estímulos. Após descalcificação maxilar, cortes verticais de congelação dos molares, com 30 µm de espessura, serviram para coloração da hemateína-eosina e imunocoloração do CGRP, enquanto cortes de criostato de 10 µm se utilizaram para imunocolorações com o anticorpo OX6.

B. Activação do c-*fos*. Animais cujos dentes foram submetidos a estimulações térmicas e mecânicas, nóxicas e inócuas, e controlos intactos, foram perfundidos com fixador 2 horas depois do início da estimulação. Retiraram-se o tronco cerebral e a medula cervical alta que se imergiram no fixador. Cortes seriados de congelação desde o topo rostral do

núcleo sensitivo principal do trigémio até à parte alta da medula espinal cervical, à espessura de 30 μm, foram seccionados no plano coronal. Um em cada 3 cortes foi imunocorado com anticorpo anti-Fos oferecido pelo Dr. S. P. Hunt (Cambridge), seguido do protocolo ABC. As células Fos-IR contaram-se nos vários núcleos do complexo trigeminal em 5 cortes de cada núcleo, dos dois lados, e foram expressas em número de células por corte (Quadro 3).

2. *Execução de cavidades artificiais*

Em animais anestesiados, efectuámos cavidades por brocagem na face vestibular da raíz vestíbulo-mesial do primeiro molar inferior. A raíz vestíbulo-mesial foi posta a descoberto por rebatimento da gengiva aderida. As cavidades foram superficiais ou profundas mas limitadas à dentina, e noutros casos profundas com atingimento da polpa. Os animais foram fixados por perfusão com paraformaldeído ao fim de 1 hora, 2, 3, 4, 7, 10 e 14 dias, e os dentes processados, após descalcificação, para coloração com hemateína-eosina e imunocolorações para CGRP e o antigénio 1-A.

3. *Marcação anterógrada no gânglio semilunar*

Na face oclusal do primeiro molar superior, de ratos anestesiados, foi efectuada uma cavidade, com broca esférica, até surgir uma gota de sangue indicando que a polpa estava vital. Seguidamente, com um escavador de dentina, removeu-se o tecto da câmara pulpar, lavou-se repetidamente a polpa exposta com hipoclorito de sódio a 1% e soro fisiológico até se eliminar o sangramento. Injectou-se então 1 μl de uma solução de subunidade B da toxina da cólera (CTb) a 1% em tampão fosfato (List, Campbell, CA, EUA) com uma seringa de Hamilton. Lavou-se novamente o orifício com hipoclorito a 1% para eliminar restos de sangue e CTb. O orifício foi então fechado com cimento provisório. Passados 5 dias o animal foi fixado por perfusão e retirado o

gânglio semilunar ipsilateral. Cortes de congelação seriados de 30 μm de espessura foram imunocorados com anticorpo anti-CTb produzido no bode (List, Campbell, Califórnia, EUA) ou anticorpo anti-CGRP produzido no coelho (Amersham) ou anti-SP produzido no coelho (Peninsula). Os anticorpos secundários biotinilados foram os mesmos indicados atrás no caso do CGRP e da SP; o anticorpo biotinilado anti-bode utilizado no caso do CTb era de origem Affinity (Mamhead, Exeter, RU) e as imunocolorações foram efectuadas pelo método ABC.

Outros cortes foram tratados no mesmo banho com anticorpos anti--CTb e anti-CGRP ou anti-CTb e anti-SP. Em seguida passaram a outro banho contendo anticorpo secundário anti-bode marcado com fluoresceína a 1:800 obtido do coelho (Affinity) e anti-coelho marcado com rodamina obtido do burro a 1:30 (Dakopatts). Estes cortes foram examinados num microscópio de fluorescência Olympus com luz de excitação de 450-490 nm para visualizar a fluoresceína e de 510-560 nm para visualizar a rodamina. A área de corte das células ganglionares foi calculada pela média dos dois maiores diâmetros perpendiculares entre si e as células divididas em três populações (Ichikawa et al., 1996) de acordo com o seu tamanho (Quadro 4).

Os dentes injectados com CTb foram descalcificados e cortados a 30 μm no micrótomo de congelação. Nos cortes efectuou-se a imunocoloração para o CTb pelo método ABC, a fim de verificar se não houve extravasamento da solução injectada na polpa (CTb) para o ligamento periodontal e o osso alveolar. Nos casos onde se verificou esse extravasamento o animal foi rejeitado.

RESULTADOS

Estrutura Pulpar

A disposição dos elementos celulares era semelhante no homem e no animal de experiência embora no primeiro se notasse uma maior abundância de pulpócitos, vasos e nervos. Nas colorações histológicas de rotina, quer na polpa isolada por dissecção sem descalcificação, situação mais frequente no material oriundo do homem (Figs. 1 e 2), quer nos dentes descalcificados, situação predominante no material originário do rato (Fig. 3), a camada dos odontoblastos era constituída por células em palissada alta na polpa coronal (Fig. 4 e 5), mais achatada na zona radicular (Fig. 6). Os prolongamentos odontoblásticos apresentavam-se intactos, penetrando na pré-dentina e na dentina nos dentes descalcificados (Figs. 7 e 8), decepados ou ausentes nas polpas extraídas por dissecção (Fig. 2). Os prolongamentos odontoblásticos e os túbulos dentinários mostraram-se particularmente nítidos nas impregnações argênticas de Jabonero (Fig. 7) e na coloração de Mallory (Fig. 8). Ao microscópio electrónico, os odontoblastos exibiam ergastoplasma abundante, numerosas mitocôndrias e complexos de união entre as células vizinhas (Figs. 9-10 e 12). O retículo endoplásmico rugoso acumulava-se sobretudo na base da célula (Fig. 11). Os prolongamentos eram ricos em microtúbulos (Fig. 12).

A existência da zona acelular de Weil e da camada celular, subjacentes aos odontoblastos, só se tornou evidente nos cortes rigorosamente perpendiculares à base da pré-dentina (Figs. 13 e 14), tornando-se inaparente nos cortes oblíquos. A caracterização da estrutura dos pulpócitos mereceu-nos particular atenção por geralmente receber escasso relevo na literatura (Avery, 1991). Com qualquer coloração histológica evidenciou-se o núcleo oval e o exíguo citoplasma alongado e sinuoso, por vezes estrelado (Figs. 5 e 6). O exame ultrastrutural mostrou, nos dentes permanentes do adulto, que os pulpócitos eram, na sua maioria, pobres em retículo endoplásmico rugoso, assumindo o aspecto clássico dos fibrócitos maduros, pobres em organelos (Fig. 15). Eram raras as células de citoplasma mais avantajado e contorno

arredondado, ricas em retículo endoplásmico e complexos de Golgi, configurando o aspecto típico dos fibroblastos secretores jóvens (Fig. 16).

A contagem de 200 pulpócitos na zona subodontoblástica e outros 200 no centro da câmara pulpar do rato mostrou que apenas cerca de 10% eram de tipo jovem em qualquer das duas localizações. Após imunocolorações em ML, as células B e T eram extraordinariamente raras mas as células apresentadoras de antigénio que expressavam o antigénio I-A utilizando o anticorpo OX6, ocorriam abundantemente em toda a extensão da polpa normal, quer sinuosas de morfologia dendrítica, quer ovalares de aspecto macrofágico (Fig. 17).

A matriz intercelular apresentava-se amorfa ou com o aspecto reticular próprio de um tecido conjuntivo laxo sem formações fibrosas claramente delineadas (Fig. 18). De facto, com o método de Mallory enquanto as fibras de colagéneo do periodonto apareciam coradas de vermelho (Fig. 19) não havia qualquer coloração do mesmo género na polpa (Fig. 20). Com o Van Gieson havia um fundo intersticial vermelho apenas nos feixes vásculo-nervosos da polpa humana (Fig. 21). As colorações para a reticulina forneceram mais dados. Tanto a impregnação argêntica de Laidlaw, como a de Sweet, revelaram uma fina malha argirófila que na periferia da polpa coronal humana ocorria sobretudo na zona subodontoblástica (Fig. 22) insinuando delgados filamentos sinuosos entre os odontoblastos. No resto da polpa, a rede argirófila era pouco densa (Fig. 23). Não se vislumbrou qualquer coloração específica das fibras elásticas pela orceína ácida na matriz intercelular da polpa.

O exame da polpa ao microscópio electrónico revelou que nas imediações dos odontoblastos e dos vasos e nervos da polpa, apareciam numerosas fibrilas colagéneas (Figs. 24 e 25). Fora destes locais as fibrilas colagéneas eram mais escassas. Eram frequentes as microfibrilas de 10 nm no espaço extracelular que, no caso de fixação com ácido tânico (Cotta-Pereira et al., 1978), formavam redes contíguas às fibrilas colagéneas, semelhantes às fibras oxitalânicas da derme (Fig. 25).

O método de Mallory evidenciou a enorme riqueza vascular da polpa nos cortes verticais espessos (Fig. 26). Já nos cortes finos de 7 µm podiam observar-se arteríolas e vénulas em corte transversal, que nas colorações da orceína ácida mostravam uma espessa limitante elástica externa (Fig. 27). Não havia porém limitante interna. As arteríolas de menor calibre, com uma única assentada de miócitos, eram aparentemente desprovidas de elastina (Fig. 27). As vénulas de lume frequentemente amplo e parede delgada, sem fibras musculares lisas, não eram distinguíveis dos linfáticos. Nos cortes ultrafinos, os capilares revelaram-se todos do tipo contínuo, adornados de pericitos (Figs. 15 e 28). Finos capilares ocorriam até às vizinhanças da pré-dentina (Fig. 29).

Inervação Pulpar

Quanto à estrutura histológica dos nervos, na região apical da polpa humana e à altura do colo do dente, observaram-se numerosos feixes vásculo-nervosos nas colorações histológicas de rotina (Fig. 30). Aí ocorriam grupos densos de perfis nervosos compostos de numerosas fibras mielínicas de pequeno calibre, entre as quais apareciam pequenas áreas celulares, presumivelmente pertencendo a células de Schwann e células do endoneuro (Fig. 31). Ao exame ultrastrutural, as células de Schwann distinguiam-se bem dos elementos conjuntivos (Fig. 16) pela lâmina basal circundante (Figs. 32 e 33). O fascículo nervoso apresentava-se frequentemente separado das duas ou três arteríolas ou vénulas, presentes no feixe vásculo nervoso, por uma cercadura de células perineurais (Fig. 34). As fibras mielínicas eram geralmente delgadas (Figs. 32-34) com diâmetros transversais variáveis (média dos dois diâmetros perpendiculares entre si incluindo a mielina). As medições efectuadas no rato revelaram diâmetros entre 1,2 e 4,4 µm (n=122 fibras) na coroa e entre 1,1 e 4,6 µm na polpa radicular (n=168). Na câmara pulpar do homem, os diâmetros iam

de 1,2 a 6,7 μm (n=98), mas as fibras com mais de 5 μm foram apenas três. As fibras amielínicas eram numerosíssimas em toda a polpa, invaginadas no citoplasma das células de Schwann (Fig. 32). À medida que nos aproximávamos da zona da corôa, predominavam os feixes nervosos avasculares de calibre muito diverso. Perto dos odontoblastos por vezes ocorriam fibras nervosas mielínicas isoladas (Fig. 35).

O melhor processo para seguir o trajecto e distribuição das fibras nervosas da polpa foi o da imunocoloração das proteínas ou neuropeptídeos que elas contêm. A proteína S-100 encontra-se associada aos pericários grandes do gânglio semilunar (Ichikawa et al., 1997), que dão origem na polpa a fibras mielínicas. No entanto, esta imunocoloração não tinha sido até agora utilizada na polpa. Nos cortes verticais do molar descalcificado do rato, observámos feixes nervosos grossos imunocorados para a S-100 que percorriam longitudinalmente a polpa radicular emitindo escassos colaterais nesta zona (Fig. 36). À altura do colo dicotomizavam-se em filetes mais delgados cujas ramificações terminais finas penetravam moderadamente a zona acelular e a palissada odontoblástica (Fig. 37). Não se viram fibras finas a insinuar-se nos túbulos dentinários. No homem, a rede nervosa periférica era mais densa, desenhando um plexo de Raschkow de grande nitidez (Fig. 38). Na polpa isolada, em que se efectuaram a maioria das observações no homem, era também evidente o plexo de Raschkow subjacente à dentina ausente (Fig. 40). Por vezes a coloração imunológica desenhava as células de Schwann (Fig. 39).

A imunocoloração para o CGRP foi por nós utilizada para demonstrar as fibras nervosas sensitivas somáticas, amielínicas e mielínicas finas. A rede nervosa aparecia formada por filamentos de diâmetro variável, mas muito mais finos do que na rede imunorreactiva à proteína S-100 (Fig. 41). As ramificações periféricas das fibras que emergiam dos troncos no colo do dente formavam um denso plexo subodontobástico de Raschkow na polpa radicular e coronal, e havia abundante penetração dentinária no rato (Fig. 41) e no homem (Fig. 42). As fibras pulpares mais periféricas tinham frequentemente trajecto em rosário pontuado, com inúmeras varicosidades (Fig. 42). Tratan-

do-se de fibras sensitivas finas, as únicas que contêm este peptídeo, é muito provável que as varicosidades correspondam a certos perfis amielínicos CGRP imunorreactivos (IR) mais volumosos, invaginados nas células de Schwann e contendo vesículas sinápticas pequenas claras e algumas grandes e densas, que têm sido assinalados ao microscópio electrónico na parede da bexiga (Gabella e Davis, 1998; Wakabayashi et al., 1993). Na parte central do colo ou da coroa, as fibras mostravam-se frequentemente interrompidas por uma dilatação triangular que pode corresponder a citoplasma Schwanniano intercalado no trajecto (Fig. 42).

As fibras nervosas imunocoradas para a SP apresentavam aspecto muito semelhante às do material CGRP-IR, embora o número de fibras visualizado fosse menor. Existia o mesmo trajecto em rosário e a mesma ramificação periférica densa (Fig. 43), assim como penetração nos túbulos dentinários (Fig. 44).

A inervação autónoma da polpa era consideravelmente mais discreta. As fibras NPY-IR mostraram-se particularmente evidentes na polpa radicular (Fig. 45), formando por vezes um fino plexo à roda dos vasos sanguíneos (Fig. 47). Na câmara pulpar rareavam, jamais formando um plexo de Raschkow. As fibras VIP-IR eram ainda mais raras nas duas espécies estudadas. Assumiam a mesma disposição perivascular, já assinalada a propósito da imunocoloração para o NPY, mas o plexo à roda dos feixes vasculares na polpa radicular era extremamente fino e mais longitudinal (Fig. 46).

Projecções Nociceptivas Bulbares

Nos animais intactos em que o primeiro molar não foi estimulado pelo calor nóxico (Fig. 48), não se observaram células Fos-IR nos vários núcleos do trigémeo ou na medula cervical alta. Nos animais intactos porém (Fig. 48), havia sempre um aglomerado de células Fos-IR no núcleo do tracto solitário

(Sol), na parte dorsolateral do bolbo ventrolateral caudal (IRF) e na oliva inferior (IO). Estudos recentes mostraram que esta expressão do protooncogene c-*fos* resulta da acção dos anestésicos (Smith e Day, 1994), em regiões adstritas ao processamento de impulsos viscerais autónomos. Todavia, nessas zonas a dor e muitos outros estímulos estressantes não fazem aumentar o número de células Fos-imunoreactivas de forma significativa acima desse padrão básico devido à anestesia. Os estímulos nóxicos, térmicos e mecânicos, por nós praticados, determinavam, pelo contrário, um número elevado de células Fos--IR (Quadro 3) no subnúcleo caudal ipsilateral do trigémio (Vc), que ocorriam nas lâminas I e II da sua porção dorsomedial (Fig. 49).

Na transição (Vi/Vc) para o subnúcleo interpolar (Vi) havia também uma acumulação de células imunorreactivas nas lâminas I e II da porção ventral do subnúcleo caudal (Fig. 50 e quadro 3). Rostralmente à transição Vi/Vc não ocorriam células Fos-IR nos subnúcleos interpolar e oral e no núcleo principal do complexo trigeminal. Em C1-C2, a activação do c-*fos* ocorria na parte medial da lâmina I ipsilateral, e menos intensamente na lâmina X (Fig. 51 e quadro 3). Do lado contralateral, as células imunorreactivas eram significativamente menos numerosas nas três regiões (Figs. 48-51 e quadro 3). Os valores ipsilaterais eram muito mais altos que os provocados pelos estímulos considerados inócuos (Quadro 3).

Quadro 3 - Número médio de células c-*fos* (±D.p.) por corte por cada tipo de estimulação (n = número de animais)

Localização	*Térmica nóxica (n = 5)*		*Mecânica nóxica (n = 5)*		*Térmica inócua (n = 5)*		*Mecânica inócua (n = 5)*	
	Ipsil.	*Contral.*	*Ipsil.*	*Contral.*	*Ipsil.*	*Contral.*	*Ipsil.*	*Contral.*
Vc	64,6± 13,5	22,6±11,5	74,0±12,6	12,6±10,5	11,5±6,5	5,5±2,8	28,5±6,5	5,0±2,0
Vi/Vc	120,0±27,5	35,2±13,2	78,4±9,9	33,4±3,4	29,0±1,0	15,0±2,0	50,5±13,6	22,0±9,2
C1-C2	33,0±10,4	4,6±2,9	21,8±5,1	5,8±2,4	0	0	6,5±1,5	0

Os valores médios ipsilaterais são significativamente mais elevados ($P < 0,001$) no subnúcleo caudal (Vc), na transição (Vi/Vc) do subnúcleo caudal para o subnúcleo interpolar (Vi) e nos segmentos medulares C1-C2, após os dois estímulos nóxicos do que nos respectivos controlos inócuos (test *t* de Student). Os valores médios ipsilaterais não diferem significativamente entre os dois tipos de estímulos nóxicos excepto ao nível de Vi/Vc ($P < 0,05$).

Projecções Ganglionares

As células do gânglio contendo CTb após injecção deste traçador estável na polpa do primeiro molar maxilar, localizavam-se na porção lateral do início da divisão oftálmico-maxilar do gânglio, estendendo-se discretamente para a zona de bifurcação com a divisão mandibular (Fig. 52). O traçador acumulava-se em grânulos no pericário dos aferentes primários (Fig. 53). A distribuição por dimensão celular (Ichikawa et al., 1996) abrangia um vasto espectro de tamanhos nas categorias de pericários celulares pequenos (< 200 μm^2), médios (200-400 μm^2) e grandes (>400 μm^2), com predomínio marcado deste compartimento (Quadro 4).

Nos gânglios não imunocorados para o Ctb, as células que exibiam imunorreactividade para os neuropeptídeos, quer após revelação pelo método do ABC, quer por imunofluorescência, distribuíam-se por todo o gânglio (Fig. 54). Após contagem circunscrita à área de projecção do primeiro molar superior verificou-se que a grande maioria dos corpos celulares se distribuía preponderantemente pelos compartimentos de tamanho pequeno e médio (Quadro 4). Nas marcações duplas por imunofluorescência, as células duplamente coradas para o CTb e CGRP (Figs. 55 e 56) ou CTb e SP (Fig. 57 e 58), localizavam-se na região de projecção do dente estudado. A distribuição dimensional era a mesma das células imunocoradas para o CGRP com o método ABC. Das células CTb-IR, 26% eram CGRP-IR e 33% SP-IR.

Quadro 4 — Distribuição numérica (%) por tamanhos das células marcadas no gânglio semilunar

Células	*CTb*	*CGRP*	*SP*
Pequenas	2,1	36,3	33,1
Médias	11,7	43,7	47,1
Grandes	86,2	20	19,5
n	94	336	195

Alterações Patológicas e Experimentais

Cárie

O quadro inflamatório, que ocorria nos dentes humanos com cárie, era mais evidente nas polpas isoladas sem descalcificação (Fig. 59). O infiltrado inflamatório era semelhante nas cáries sem atingimento pulpar, em que havia dor espontânea e sensibilidade ao frio, e nos casos de exposição pulpar em que ocorria dor espontânea sem sensibilidade ao frio. O infiltrado era essencialmente composto por linfócitos, plasmócitos e alguns polinucleares (Fig. 60) na zona periférica da câmara pulpar subjacente à cárie (Fig. 59). Era frequente um certo aumento da vascularização em quase toda a polpa coronal, com edema intersticial (Fig. 61). Nas cáries com atingimento pulpar o infiltrado era mais compacto e havia enorme vasodilatação (Fig. 62). Enquanto no dente normal e nas cáries superficiais não observámos células B nem T (Fig. 63), estas ocorriam nas cáries profundas (Fig. 64).

A inervação pulpar era particularmente bem demonstrável em cortes de congelação de 30 μm de dentes descalcificados, após imunocoloração para o CGRP. Em lugar da fina rede nervosa observada na polpa normal, espessos fascículos nervosos CGRP-IR ocorriam através de toda a polpa coronal (Figs. 65 e 66). Os fascículos nervosos imunocorados pareciam associados a vasos sanguíneos, em feixes vásculo-nervosos conjuntos (Fig. 67) até à zona periférica da polpa, talvez devido ao edema existente comprimindo os vasos de encontro aos nervos. Havia também muitas células imunorreactivas, aparentemente macrófagos (Fig. 68). A despeito da grande riqueza de fibras nervosas imunorreactivas na polpa, a penetração canalicular na dentina era moderada (Figs. 69 e 70).

O exame ultrastrutural revelou a existência de grande número de fibras mielínicas com sinais moderados de sofrimento, a par de outras normais. Era frequente a retracção do axoplasma levemente densificado e a distorsão da mielina (Fig. 71). As fibras amielínicas estavam menos atingidas mas o cito-

plasma schwaniano apresentava, por vezes, aumento de microfilamentos e numerosas vesículas golgianas (Fig. 71). Alguns macrófagos mostraram-se ricos em material fagocitado e figuras mielínicas (Fig. 72).

Periodontose

De seis dentes com mobilidade de grau 3 ou 4 cuja polpa foi isolada sem descalcificação, três apresentavam dor espontânea agravada pela estimulação térmica e três não exibiam sintomatologia dolorosa. Na polpa dos dentes sensíveis ocorria atrofia com perda de células e esclerose, mais marcada na polpa radicular (Fig. 73). Na câmara pulpar predominava um discreto infiltrado inflamatório do tipo crónico rico em linfócitos (Figs. 73 e 75). Toda a polpa apresentava frequentemente abundante mineralização distrófica (Fig. 74). Alguns fascículos nervosos imunocorados para a proteína S-100 ocorriam na polpa apical (Fig. 76) assim como na corôa (Fig. 77). Ao microscópio electrónico, os nervos mielínicos apresentavam estrutura normal ou sinais de sofrimento axonal discreto (Fig. 78) ou pronunciado (Fig. 79).

Nos três casos sem dor, toda a polpa era levemente atrófica com muitos vasos de neoformação (Fig. 80). Os nervos imunocorados para a proteína S-100 eram rarefeitos e constituídos por pequenos filetes isolados (Fig. 81). A ultrastrutura das raras fibras mielínicas era normal ou mostrava discretos sinais de sofrimento axonal (Fig. 82).

Quanto à inervação sensitiva fina, expressa pela presença de fibras imunorreactivas ao CGRP, ela foi estudada em polpas isoladas de dentes sensíveis ou não. De um modo geral observou-se diminuição apreciável da rede nervosa CGRP-IR em relação ao dente normal. Os dentes quer sensíveis, quer indolores, tinham filetes nervosos finos que percorriam a polpa formando plexos pouco densos, geralmente mais numerosos nos dentes sensíveis (Fig. 83) do que nos indolores (Fig. 84).

Cavitação provocada

Durante os 4 dias subsequentes à execução de uma cavidade na dentina, observou-se profunda desorganização da camada dos odontoblastos e a ocorrência de células inflamatórias no centro do corno pulpar subjacente (Figs. 85 e 86). Numerosas células OX6-IR apresentadoras de antigénio ocorriam dentro e fora da zona inflamada (Fig. 87). Notavam-se também áreas de aspiração de odontoblastos e células OX6-IR para o interior da dentina (Fig. 88). Na profundidade, a polpa mostrava estrutura normal (Fig. 85). A rede de fibras CGRP-imunorreactivas apresentava-se excluída da zona lesada mas estava conservada na zona profunda em que a polpa tinha aspecto normal (Fig. 89), e nalguns casos exibia maior densidade e ramificação com filetes nervosos grossos (Fig. 90). O quadro era semelhante no caso de haver exposição pulpar (Figs. 91 e 92).

No período entre os 5 e os 14 dias, o infiltrado linfoplasmocitário parecia ter já regredido parcialmente e o plexo nervoso mostrava-se finalmente ramificado por todo o corno pulpar, mas havia focos grosseiros de dentina reparadora de onde as fibras nervosas estavam excluídas (Fig. 93). As células OX6-IR tornavam-se abundantes na polpa reconstituída nos cornos pulpares e exibiam penetração parcial nos túbulos dentinários (Fig. 94).

Estimulação térmica

O contacto da superfície oclusal do dente com um estilete ao rubro deu origem imediata a uma alteração da polpa coronal consistindo numa aparente coagulação da matriz com edema e destruição dos pulpócitos (Figs. 95 e 96). No colo do dente porém, a polpa mantinha o aspecto normal (Fig. 95). Noutras zonas, o estroma pulpar conservava-se íntegro mas ocorriam focos de infiltrado inflamatório e desorganização da camada dos odontoblastos

que nalguns pontos apareciam como que aspirados para o interior da dentina (Fig. 97). As células OX6-IR abundavam na zona de desorganização dos odontoblastos, nalguns pontos insinuando-se na pré-dentina (Fig. 98), sendo raras na zona coagulada (Fig. 98). Nessas primeiras horas após aplicação do estímulo, o plexo CGRP-IR encontrava-se excluído dos focos de coagulação subjacentes à estimulação, ocorrendo apenas na zona profunda da polpa (Fig. 99).

Dos 2 aos 12 dias, os focos de coagulação achavam-se já preenchidos por infiltrado inflamatório (Fig. 101) rico em linfócitos e linfoblastos (Fig. 102). Os nervos CGRP-IR ocorriam agora com grande densidade na polpa sã, dispostos em numerosos feixes grossos e compactos embora continuassem excluídos do infiltrado inflamatório superficial (Fig. 100). Neste havia abundantes células OX6. No final deste período, aos 7-12 dias certas fibras terminais, mais finas, formavam uma rede densa na periferia da zona inflamatória em regressão de onde continuavam excluídas, aproximando-se intimamente da dentina (Fig. 104). Dos 12 aos 20 dias, a polpa aparecia quase totalmente reconstituída se bem que com maior celularidade do que nos dentes não estimulados e rodeada por espessa faixa de dentina reparadora (Fig. 103). As fibras nervosas invadiam já toda a polpa reconstituída mas não penetravam na dentina reparadora (Fig. 105). As células OX6-IR disseminavam-se pela polpa cicatrizada mas também não ocorriam na dentina reparadora (Fig. 106).

DISCUSSÃO

Estroma Pulpar Normal

As observações de Han et al. (1965) permitiram distinguir na polpa do incisivo do cobaio três tipos de *pulpócitos*. Na extremidade em crescimento permanente do incisivo, correspondendo à zona apical do dente, os pulpócitos apresentavam a estrutura das células mesenquimatosas em diferenciação, com hialoplasma claro, mitocôndrias pequenas e pobres em cristas. Na zona médio-pulpar, pelo contrário, as células assumiam o fenótipo do fibroblasto jovem em processo de maturação, activo na secreção da substância intersticial, dotado de citoplasma rico em organelos, nomeadamente retículo endoplásmico rugoso com cisternas dilatadas, múltiplos dictiossomas golgianos e mitocôndrias compridas com cristas transversais. Já na extremidade externa distal da polpa predominavam as células esguias de citoplasma exíguo e pobre em ergastoplasma, genericamente designadas nos tecidos conjuntivos como fibrócitos. Nos dentes molares, recolhidos para o nosso estudo, essa evolução, sugestiva de uma relação directa entre a actividade de síntese proteica do pulpócito e o crescimento da polpa, não se verificou, dado tratar-se de molares adultos que não estavam em crescimento. Tanto na polpa radicular como nas câmaras pulpares, cerca de 90% dos pulpócitos eram do tipo fibrocítico fazendo supor uma renovação muito lenta do interstício a cargo das poucas células ricas em organelos, designadas na literatura como pulpoblastos (Baume, 1980).

Outra questão, porém, relaciona-se com o papel dos pulpócitos na formação da dentina reparadora. De facto nas cáries profundas verificou-se destruição local dos odontoblastos (Trowbridge, 1981) e o aparecimento de uma nova fiada de células dispostas em palissada que elaboravam uma ponte de dentina secundária de encontro à dentina primária (Magloire et al., 1988). Tais células diferiam das células papilares que originam os odontoblastos formados na dentinogenese primária por segregarem os colagéneos I e III enquanto aquelas células papilares não sintetizavam colagéneo III (Magloire et. al., 1988). Também nas polpas expostas após limpeza completa da cárie e

forramento com hidróxido de cálcio tem sido descrito o mesmo fenómeno (Yamamura, 1985). O aparecimento destes odontoblastos neoformados tem sido atribuído à metaplasia dos pulpócitos vizinhos (Ruch, 1990).

Esta hipótese sugeriu-nos a possibilidade de os pulpócitos da camada celular possuírem, mesmo nos dentes intactos, uma estrutura mais aparentada com a dos odontoblastos, ou seja uma maior riqueza em retículo endoplasmático do que os pulpócitos do centro da corôa pulpar. Tal não foi por nós, porém, confirmado, dada a baixa percentagem encontrada (10%) de células ricas em retículo endoplásmico naquela zona, a qual era semelhante à que ocorria no resto da polpa. Devo recordar, no entanto, que outros autores têm observado uma destruição apenas parcial dos odontoblastos nas cavidades artificiais no rato com reconstituição subsequente à custa dos odontoblastos sobreviventes sem metaplasia odontoblástica de pulpócitos (Chiego Jr., 1992). Os odontoblastos remanescentes formariam eles próprios a ponte de dentina reparadora.

O escasso número de *células imunitárias* encontradas na polpa humana normal, imunocoradas pelos anticorpos anti-linfócito T e anti-linfócito B, contrastava com o elevado número de células coradas pelo anticorpo OX 6, específico das células apresentadoras de antigénio. Observámos numerosas células de aspecto dendrítico, de contorno muito sinuoso e prolongamentos múltiplos, ou macrofágico, ovais ou redondas sem prolongamentos. Em desacordo com Okiji et al. (1992) que descreveram as células dendríticas principalmente localizadas na periferia pulpar junto dos odontoblastos, e as células macrofágicas predominando no centro da câmara pulpar, ambos os tipos se distribuíam por toda a polpa coronal no nosso material. Algumas células dendríticas insinuavam um prolongamento nos túbulos dentinários da pré-dentina, facto anteriormente assinalado apenas em material patológico (Oshima et al., 1995).

As células dendríticas da polpa têm sido ultimamente consideradas uma população celular importante da polpa (Jontell et al., 1998). No homem, 90% das células dendríticas que exprimem o antigénio HLA-DR são também

imunorreactivas a marcadores típicos dos macrófagos e a um marcador característico das células dendríticas da pele (Okiji et al., 1987). Por isso, as células de morfologia dendrítica da polpa podem ter também propriedades macrofágicas, tais como as de morfologia propriamente macrofágica. De facto, no primeiro molar do rato não vimos qualquer diferença na distribuição dos dois tipos. A acumulação destas células imunocoradas pelo anticorpo OX6 na polpa periférica dos dentes com cárie (Izumi et al., 1996), ou com cavitação experimental (Ohshima et al., 1995), sugerem que elas tenham por missão a defesa imunitária da polpa contra a entrada de antigénios via túbulos dentinários.

A natureza do *material fibroso intersticial* é outro ponto controverso e mal definido no aspecto histológico. As nossas observações de microscopia electrónica mostraram escassez de fibrilas colagéneas nos espaços livres do estroma, que ocorriam sobretudo nas imediações dos feixes vásculo-nervosos e na região subodontoblástica. As impregnações argênticas em ML revelaram, além disso, que a totalidade desse material era constituída por fibras de reticulina. Por outro lado, os métodos de van Gieson, Masson ou Mallory não revelaram qualquer colorabilidade para as fibras colagéneas, a não ser no interior dos feixes vásculo-nervosos. Concluímos que as fibras colagéneas deverão ser aí sintetizadas pelos fibroblastos do endoneuro. Estas nossas observações estão de acordo com achados bioquímicos prévios que atestam a abundância do isotipo III do colagéneo no estroma pulpar e a ausência virtual do colagéneo I (Shuttleworth, 1990b).

Em contrapartida, foi-nos possível confirmar a ocorrência de numerosas microfibrilas de 10 nm, quer à periferia dos pulpócitos, quer misturadas com as fibrilas colagéneas. De acordo com os estudos bioquímicos de Baba et al. (1985), estes materiais são constituídos, em muitos tecidos conjuntivos, por glicoproteínas. Todavia, tais elementos morfológicos têm também sido considerados como podendo conter fibronectina (Chen et al., 1978), proteoglicanos (Hay, 1978) ou amilóide (Cohen e Calkins, 1959).

Tais componentes microfibrilares formavam, com certa frequência, na polpa fixada na presença de ácido tânico, densas redes pouco extensas a ladear as fibrilas colagéneas, o que é muito sugestivo da ocorrência de fibras oxitalânicas já assinaladas por Bradamante et al. (1980). Todavia, não o vimos associado ao denso material amorfo próprio da elastina, determinando a transição para a elaunina ou para as fibras elásticas propriamente ditas, como acontece na derme (Cotta-Pereira et al., 1978). Glicoproteínas e proteoglicanos, cuja existência tem sido abundantemente demonstrada na polpa pela análise bioquímica (Van Ameronghen et al., 1990), são, tal como as fibrilas colagéneas e as fibras oxitalânicas, produtos de síntese dos pulpócitos ou dos fibroblastos do endoneuro. O facto de termos encontrado poucos pulpócitos com características de células activas na síntese proteica sugere que a renovação destes materiais seja lenta no dente adulto.

Rede Nervosa Sensitiva

Nervos mielínicos

A fim de conseguirmos uma visão global da inervação dentária, utilizámos inicialmente neste trabalho a imunocoloração da proteína S-100. Ela faz parte de uma família de proteínas ligadas ao ião cálcio que ocorrem no pericário e axónio dos neurónios assim como nas células gliais do sistema nervoso central e nas células de Schwann do sistema nervoso periférico (Haglid et al., 1974). Em princípio, a sua imunocoloração deveria, por isso, reproduzir a totalidade da rede nervosa do dente embora menos intensamente nos terminais livres já desnudados do envólucro schwaniano. Na realidade, as nossas imagens revelaram uma arborização nervosa principalmente formada por

filetes relativamente grossos que, tanto no homem como no rato, raramente ultrapassavam distalmente o plexo de Raschkow, estando ausentes da dentina.

Estudos recentes têm demonstrado a presença deste marcador nas células sensitivas grandes do gânglio de Gasser do rato (Ichikawa et al., 1997). Além disso, havia marcada colocalização nas células grandes do gânglio de S-100 e de duas outras proteínas, igualmente ligandos do cálcio, a parvalbumina e a calbindina (Ichikawa et al., 1995 e 1996). Uma vez que estudos imunocitoquímicos ultrastruturais revelaram que todas as fibras imunorreactivas à calbindina eram mielínicas na polpa (Ichikawa, 1996), o que também sucedia com a maioria das imunorreactivas à parvalbumina (Ichikawa et al., 1995), tudo leva a crer que o mesmo aconteça com as fibras S-100-IR (Ichikawa et al., 1997). A nossa demonstração (a primeira segundo cremos) da rede nervosa dentária imunorreactiva à proteína S-100 confirma inteiramente esta hipótese. A escassez de filetes nervosos na zona acelular e a sua ausência na dentina, mostrou que este método não revela as fibras amielínicas, o que por outro lado pressupõe a carência de uma reacção suficientemente forte nas células de Schwann que as envolvem. Todavia, nos dentes humanos descortinámos células de Schwann a acompanhar os nervos grossos na câmara pulpar (Fig. 39), o que sugere que apenas as células de Schwann grandes que acompanham os nervos mielínicos sejam imunorreactivas para a S-100.

As nossas observações puramente morfológicas a nível ultrastrutural confirmaram a bem conhecida importância das fibras mielínicas de pequeno calibre na polpa. Enquanto Nair et al. (1992) encontraram cerca de 93% de fibras mielínicas com diâmetro inferior a 5 μm no molar humano com o ME, nós encontrámos uma percentagem de 100% no rato e de 97% no homem. Trata-se portanto do contingente mielínico fino da classe fisiológica Aδ, que conduz o impulso nervoso a menos de 30 m/s, responsável pela transmissão da dor cortante característica da sensibilidade evocada a partir da dentina (Nähri, 1990).

Tem-se sugerido que as fibras mielínicas finas da polpa sejam os ramos adelgaçados de fibras mielínicas grossas existentes nos nervos alveolares

(Byers, 1984). Isto estaria de acordo com o facto de a maior parte das células aferentes primárias da polpa, marcadas com o marcador flúor-ouro injectado na polpa, que ocorriam no gânglio semilunar do rato, serem de tamanho médio e grande (Fried et al., 1989). Sugimoto et al. (1987) utilizaram HRP como traçador, tendo também verificado que os pericários pequenos, os quais nos gânglios da medula dão origem à maioria das fibras sensitivas amielínicas (Sugiura et al., 1988) eram raros no gânglio semilunar, apenas 2 a 3% das células marcadas. Em contrapartida, os pericários de área superior a 700 μm^2 apareciam marcados a partir da polpa do molar do rato numa proporção de 30%. O mesmo autor com HRP-WGA constatou que a maioria das células marcadas mediam mais de 300 μm^2 (Sugimoto et al., 1990). Estes achados contrastavam, porém, com dados mais antigos obtidos com o método da degenerescência subsequente à pulpectomia, a qual provocava cromatólise sobretudo das células ganglionares pequenas (Brashear, 1936).

A fim de tentar destrinçar esta controvérsia, procedemos ao preenchimento da polpa com um traçador, a subunidade B da toxina da cólera (CTb), considerado de grande especificidade na absorção e transporte por parte dos axónios de vários calibres (Ericson e Blomqvist, 1988). Os nossos resultados foram igualmente no sentido do predomínio da marcação em células grandes (Quadro 4). Não concluímos, todavia, pela teoria segundo a qual os nervos mielínicos da polpa podem ser ramos adelgaçados de axónios grossos dos nervos alveolares. Efectivamente os registos electrofisiológicos conseguidos por Jyväsjärvi e Kniffiki (1989) no nervo alveolar inferior do gato, após estimulações eléctricas nóxicas, térmicas ou mecânicas da polpa, mostraram, como vimos na introdução, apenas conduções lentas próprias das fibras amielínicas (80%) e mielínicas finas (20%), o que permite concluir que as fibras finas da polpa se continuam nos nervos alveolares. Em conclusão, o tamanho das células ganglionares da zona do gânglio semilunar que projecta para o dente não se relaciona de forma directa com o calibre e a velocidade de condução dos respectivos axónios, como sucede nos aferentes primários espinais. Ao

contrário destes, as células grandes devem dar origem, tal como as de tamanho médio, a axónios mielínicos Aδ.

Quanto aos raros axónios sensitivos grossos Aβ com diâmetros acima de 5 μm (Jones e Anderson, 1982; Nair et al., 1992), que só encontrámos em quantidade mínima no material humano, responsáveis nos tecidos cutâneos pelo transporte do afluxo sensitivo inócuo, a sua função sensitiva no dente não está plenamente esclarecida. Para alguns tais receptores poderiam originar aquelas sensações de pré-nocicepção que o sujeito experimenta após estimulações eléctricas de baixo limiar (McGrath et al., 1983). Contudo, estímulos mecânicos inócuos aplicados ao canino intacto do gato determinaram respostas no gânglio semelhantes às oriundas dos corpúsculos de Pacini da pele (Dong et al., 1993), sugerindo a existência de receptores inócuos intradentais distintos dos que ocorrem no periodonto. Trata-se de um ponto ainda mal esclarecido, que aguarda investigação futura.

Nervos amielínicos

As nossas observações com a imunocoloração para a proteína S-100 foram sugestivas de que o plexo de Raschkow contém ainda numerosas fibras mielínicas. Mas, tanto aqui como no centro da câmara pulpar e na polpa radicular, o exame ultrastrutural revelava que as fibras amielínicas eram ainda mais numerosas. Na camada odontoblástica e terço proximal da dentina, é comum referir-se a exclusiva ocorrência de nervos amielínicos (Byers, 1984), em grande parte ramos pré-terminais de fibras Aδ como se conclui a partir das respostas electrofisiológicas obtidas no nervo alveolar após estimulação da superfície do dente (Nähri, 1990). No entanto, surpreendemos também algumas fibras mielínicas isoladas perto dos odontoblastos (Fig. 35).

Para visualizarmos a distribuição das fibras amielínicas na polpa socorremo-nos das imunocolorações para os neuropeptídeos. Dois marcadores têm sido recentemente utilizados para marcar as fibras finas, que ao mesmo

tempo são exclusivos dos axónios sensitivos somáticos, o CGRP e a SP. O primeiro foi visto ocorrer em fibras amielínicas e num pequeno contingente de fibras mielínicas de pequeno calibre da polpa com o ME e o segundo nas amielínicas (Byers et al., 1992a). De acordo com esta preferência pelos axónios finos, as nossas imunocolorações para o CGRP-IR forneceram um quadro de distribuição muito diverso do desenhado pela rede S-100-IR. As fibras peptidérgicas eram geralmente delgadas, dando origem a um plexo de Raschkow denso e a uma penetração dentinária abundante.

Nestes dois locais o aspecto pontuado das fibras, com sucessivas dilatações em rosário, era notório. Estas varicosidades podem corresponder às dilatações seriadas ao longo das fibras amielínicas, contendo vesículas sinápticas agranulares e granulares e mitocôndrias, assinalada ao ME nos túbulos dentinários por Avery e Chiego Jr. (1990), Byers (1984) e Frank (1968). O aspecto varicoso é, de resto, habitual nas fibras imunocoradas para os neuropeptídeos, incluindo os utilizados na demonstração dos nervos autónomos (Luthman et al., 1992), faltando no entanto um estudo de correspondência rigorosa entre a mesma fibra vista em ML e ME para resolver o problema. Contudo, deve referir-se que, na parede da bexiga do rato, perfis sensitivos varicosos, semelhantes aos observados nos túbulos dentinários apresentavam-se imunocorados a nível de ME para a SP (Wakabayashi et al., 1993) e o CGRP (Gabella e Davis, 1998).

Este facto deixa em aberto a possibilidade de que tais varicosidades funcionem, a exemplo dos botões de passagem das fibras motoras, como locais de libertação, não de neurotransmissores, mas de neuropeptídeos. O símile não é inteiramente óbvio porquanto tais varicosidades embora se encostem a fibras musculares lisas (Wakabayashi et al., 1993) ou a prolongamentos odontoblásticos nos túbulos dentinários (Byers, 1984), jamais ostentam contactos sinápticos. Seria mais apropriado equipará-las aos botões das fibras noradrenérgicas vasomotoras que se conservam a certa distância das fibras musculares lisas das arteríolas, as quais recebem o contacto das catecolaminas libertadas pelos botões das fibras simpáticas através da difusão intersticial

das mesmas. Sabe-se, por outro lado, que as fibras sensitivas, em situações de inflamação, são percorridas por correntes antidrómicas que levam à libertação dos peptídeos SP e CGRP, os quais incrementam localmente a vasodilatação e a acumulação de líquido intersticial. Experiências de estimulação eléctrica do nervo alveolar inferior do gato efectivamente causaram exsudação a partir da dentina exposta, a qual requeria o recrutamento das fibras Aδ (Vongsavan e Matthews, 1992). O contrário, isto é a chamada de fluido do exterior para a dentina, ocorria se se procedesse à estimulação do simpático cervical resultando em vasoconstrição pulpar. Quanto à vasodilatação local operada pelo CGRP tem sido atribuída à estimulação da secreção de factores relaxantes do músculo liso no endotélio vascular (Heyeraas e Kvinnsland, 1992).

De acordo com observações anteriores no rato (Heyeraas et al., 1993) a rede SP-IR apresentava, nas nossas preparações do rato e homem uma distribuição semelhante à das fibras CGRP-IR, mas o número de fibras SP-IR era muito inferior ao das fibras CGRP-IR. A discrepância entre o número de fibras imunocoradas para os dois peptídeos afigura-se um tanto enigmática dada a colocalização total observada em outros locais. É curioso que as acções locais da SP são semelhantes às atribuídas à CGRP, nomeadamente na produção de respostas neurogénicas inflamatórias tais como vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular (Fazekas et al., 1992). Além disso, ambas parecem ter propriedades tróficas na dentinogénese (Jacobsen e Heyeraas, 1996), já que a deplecção de CGRP e SP, após ressecção do nervo alveolar ou injecção subcutânea repetida de capsaicina, causa uma redução marcada da formação de dentina. O CGRP tem, além disso, um comprovado efeito estimulador do desenvolvimento de culturas ósseas (Bjurholm et al., 1992) e a SP exerce efeito trófico sobre o crescimento do tecido conjuntivo (Nilsson et al., 1985).

A presença de neuropeptídeos nas fibras Aδ e C, responsáveis pela sensibilidade dolorosa dentária, permite ainda supor que, além dos efeitos locais a que aludimos, eles estejam também relacionados com a sensibilidade dolo-

rosa. Existem dados na literatura que apoiam o papel dos neuropeptídeos na transmissão do afluxo sensitivo nociceptivo. Assim, a aplicação tópica de capsaicina à bexiga dessensibiliza transitoriamente os nervos sensitivos vesicais que deixam de aferir o grau de dilatação da víscera enquanto dura a deplecção reversível de CGRP e SP nos mesmos nervos (Avelino e Cruz, 2000).

Em conclusão, ambos os peptídeos são marcadores electivos das fibras sensitivas finas do dente. Dado que porém o CGRP é de longe o mais abundante, dele nos servimos para estudar os efeitos nervosos das lesões patológicas dentárias.

Outro ponto ainda relacionado com estes marcadores peptídicos diz respeito à sua ocorrência nas células sensitivas do gânglio semilunar. O presente estudo confirmou os achados de Fried et al. (1989) e Ichikawa et al., (1995) segundo os quais o CGRP e a SP ocorrem principalmente nas células pequenas e de tamanho médio no gânglio. Parece legítimo sugerir que elas dêem origem, respectivamente, a axónios amielínicos e mielínicos finos da polpa.

As restantes fibras mielínicas marcadas na polpa por S-100 são provavelmente axónios mielínicos do resto das células de tamanho médio e das células grandes do gânglio constituindo o contingente de fibras Aδ nociceptivas que não contêm CGRP ou SP. Só trabalhos futuros poderão elucidar se terão funções sensitivas distintas das fibras mielínicas Aδ que contêm estes dois neuropeptídeos, sendo porém evidente que não deverão intervir nos fenómenos inflamatórios e tróficos locais que são apanágio das fibras contendo neuropeptídeos. A possibilidade de sobreposição de imunorreactividades para a CGRP/SP e S-100 não foi testada no presente trabalho e aguarda futura elucidação.

Finalmente, importa referir que no nosso material encontrámos grande frequência de grupos de nervos mielínicos e amielínicos pulpares aglomerados em feixes vásculo-nervosos, não só na polpa apical (Byers, 1984) mas também na câmara pulpar. Os elementos nervosos apresentavam-se dispostos em fascículos, no homem e no rato frequentemente rodeados de baínha perineural, considerada até agora como ausente ou incompleta na polpa

(Bishop, 1981). Os perfis perineurais não possuíam lâminas basais, o que depõe a favor de uma origem fibroblástica e não neuroectodérmica (Shanta e Bourne, 1968).

Inervação Autónoma

A imunocoloração para o NPY revelou-nos a sua quase exclusiva ocorrência em plexos perivasculares mais abundantes na polpa apical do que na coronal. Em várias espécies de mamíferos, as imunocolorações para o NPY e a enzima dopamina-beta-hidroxilase, que converte a dopamina em noradrenalina, exibiram total co-localização em vários tecidos periféricos, incluindo a polpa (Uddman et al., 1984). Por isso, a rede NPY-IR que se desenha nas nossas preparações, reproduz a inervação simpática pulpar vasomotora. O aspecto varicoso das fibras sugere a existência de botões sinápticos contendo e libertando catecolaminas, nomeadamente noradrenalina, facto a comprovar futuramente em imunocolorações ultrastruturais.

Verificou-se recentemente com a cromatografia líquida (Casasco et al., 1995) que a concentração de noradrenalina na polpa era 60 a 90 vezes maior do que as de adrenalina ou dopamina, o que leva a concluir que a primeira deve ser o neurotransmissor utilizado pelas fibras simpáticas. Isto era de esperar após as experiências de Liu et al. (1990), mostrando redução de fluxo sanguíneo pulpar com o laser-Doppler depois da injecção arterial de noradrenalina, ou os achados mais antigos de Edwald e Scott (1971) com redução da tensão do tecido pulpar devida à estimulação eléctrica dos nervos simpáticos.

Deve referir-se que as redes de fibras simpáticas, ao contrário das de fibras sensitivas, não são influenciadas pela inflamação que ocorre durante a exposição pulpar (Oswald e Byers, 1993). Também não proliferam após destruição da rede sensitiva, como sucede no tracto urinário por exemplo (Sann et al., 1986), onde passam a dispôr do NGF que era utilizado pelas fibras

sensitivas destruídas. Efectivamente, as fibras simpáticas do dente carecem do receptor p75 do NGF (Fried e Risling, 1991).

Finalmente, importa referir que enquanto o NPY no rato normal está praticamente ausente do gânglio semilunar que as fibras simpáticas apenas atravessam para se incorporarem no trigémeo, após corte do nervo mandibular aparece nas células ganglionares de tamanho médio em colocalização com o CGRP. Além disso, durante a regeneração das fibras pulpares o NPY aparece no plexo de Raschkow e na dentina também em colocalização com o CGRP (Fristad et al., 1996). Assim, o NPY após axotomia e subsequente regeneração do nervo alveolar passa a ser transitoriamente transcrito nas células aferentes primárias sensitivas do gânglio do trigémeo e não apenas nos neurónios do gânglio cervical superior como sucedia em circunstâncias normais (Fristad et al., 1996). O peptídeo deixa, assim, de ser um marcador simpático exclusivo em situações de regeneração nervosa.

Idêntico fenómeno acontece com o presumível marcador das fibras parassimpáticas, o VIP, que nas nossas preparações apenas ocorria em redes nervosas perivasculares pouco desenvolvidas e apenas na região apical. Também aqui se observou (Fristad et al., 1998) que, durante a regeneração das fibras do nervo alveolar, o VIP aparecia juntamente com SP em células pequenas do gânglio de Gasser assim como em fibras pulpares neoformadas junto dos odontoblastos. De resto as funções desempenhadas em circunstâncias normais pela suposta rede colinérgica VIP-IR são praticamente desconhecidas.

Em conclusão, os dois peptídeos NPY e VIP são marcadores do simpático e do parassimpático, respectivamente, no animal normal. Durante a regeneração experimental dos nervos alveolares, ocorre também a presença dos dois peptídeos nos neurónios sensitivos. Supõe-se que os peptídeos NPY e VIP possam, nestas circunstâncias, desempenhar funções tróficas na regeneração dos nervos sensitivos pulpares.

Sensibilidade Dentária e Projecções Bulbares

A despeito da existência de alguns receptores mecânicos sensitivos inócuos reportados no dente com métodos electrofisiológicos (Dong et al., 1990, 1993), eles são uma escassíssima minoria comparados com os que se situam no periodonto. Praticamente toda a sensibilidade pulpo-dentinária é nociceptiva no homem, isto é, provoca a sensação de dor. Há, de resto, grande consenso no que diz respeito à ocorrência de dois tipos de nocicepção, a dor aguda, cortante, originada na dentina, e a dor crónica, surda, proveniente da polpa.

Como vimos na Introdução, os estímulos que determinam a dor aguda podem ser mecânicos, térmicos ou químicos, exercidos sobre a dentina desde que esta lhes seja acessível graças à perda de continuidade do esmalte. Não há praticamente controvérsia em que os estímulos provocam a existência do fluxo hidrodinâmico nos túbulos dentinários, o qual é transduzido pelos terminais livres das fibras nervosas aí contidas. A estimulação térmica nóxica distingue-se, porém, das outras em poder causar dor aguda mesmo sem efracção da capa do esmalte, com desencadeamento imediato de correntes de acção em fibras Aδ no nervo alveolar do animal de experiência (Pashley, 1990).

Por outro lado, ao fim de meio minuto de estimulação térmica, instala-se uma dor contínua (Hensel e Mann, 1956) parecida com a que ocorre na inflamação da polpa e que no animal de experiência origina respostas electrofisiológicas nas fibras C do nervo alveolar (Nähri et al., 1982b). As lesões histológicas provocadas pelo calor na polpa são mal conhecidas embora se saiba que tardiamente provocam proliferação das fibras sensitivas pulpares (Raab, 1992; Taylor e Byers, 1990) e libertação de neuropeptídeos (Gazelius et al., 1981). Por tal motivo, fizemos o estudo histopatológico do dente submetido ao calor nóxico que discutiremos mais adiante. A aplicação do mesmo estímulo térmico serviu-nos, além disso, para darmos o nosso contributo à

elucidação de um de dois paradoxos ainda não resolvidos no relativo à inervação dentária.

O primeiro paradoxo foi por nós já discutido e consiste na inadequação do calibre do axónio sensitivo periférico na polpa com o tamanho da célula ganglionar que lhe dá origem. O segundo paradoxo, que discutiremos agora, diz respeito às terminações dos aferentes pulpares no núcleo do quinto par. Embora certos dados clínicos e electrofisiológicos apontem para a terminação transganglionar das fibras nervosas nociceptivas apenas no subnúcleo caudal, os marcadores neuronais estáveis e outros dados electrofisiológicos mostraram projecção da inervação dentária para todos os núcleos do complexo trigeminal, incluindo os mais rostrais.

As injecções pulpares de traçadores no gato (Westrum et al., 1981; Arvidsson e Gobel, 1981), e no rato (Marfurt e Turner, 1984), efectivamente forneceram marcações transganglionares desde o núcleo principal até ao subnúcleo caudal. Na vertente neurofisiológica, as estimulações eléctricas intensas da polpa igualmente evocaram respostas celulares no núcleo principal e nos subnúcleos oral, interpolar e caudal do núcleo espinal no gato (Hu e Sessle, 1984; Khayyat et al., 1975).

A favor de um papel especial desempenhado pelo subnúcleo caudal no processamento da dor obtiveram-se, porém, algumas observações pertinentes com ambas as técnicas. Assim, no bolbo Arvidsson e Gobel (1981) observaram fibras aferentes mais espessas marcadas pelo HRP a penetrar no subnúcleo oral e apenas fibras finas a entrar no subnúcleo caudal. Contrariamente às estimulações eléctricas da polpa que não são estímulos naturais, a aplicação de calor nóxico ao dente apenas provocava respostas em células do subnúcleo caudal (Hu e Sessle, 1984). Além disso, a excitação local do subnúcleo caudal com choques eléctricos hiperpolarisava ou despolarizava as células do núcleo principal e do subnúcleo oral (Khayyat et al., 1975; Scibetta e King, 1969), de tal forma que se a estimulação dentária fôsse precedida da estimulação do subnúcleo caudal ocorriam respostas aumentadas ou reduzidas nos núcleos rostrais.

Desta forma o subnúcleo caudal parece regular a excitação produzida no subnúcleo oral e no núcleo principal pela estimulação nóxica do dente. As mensagens nociceptivas enviadas ao tálamo e córtex pelos núcleos rostrais teriam assim que ser controladas, por assim dizer, pelo subnúcleo caudal. Cumpre todavia lembrar que a interrupção das aferências ao subnúcleo caudal pelo corte das fibras do tracto espinal do trigémio (operação de Sjökvist), embora benéfica nas nevralgias da face, não mostrou efeitos curativos na dor dentária no macaco (Young et al., 1981), gato (Vyklicky et al., 1977) e homem (Young, 1982).

No presente trabalho utilizámos uma abordagem técnica diferente para lançar alguma luz nesta controvérsia. Sabe-se que a estimulação nóxica das áreas cutâneas e viscerais que projectam, quer para a medula-espinal (Hunt et al., 1987), quer para o complexo trigeminal (Anton et al., 1991), causam activação do protooncogene c-*fos* nas células pós-sinápticas às terminações dos aferentes primários. Tal activação traduz-se na transcrição da proteína Fos codificada pelo protooncogene c-*fos*. A demonstração imunocitoquímica da proteína Fos com um anticorpo anti-Fos e o método do ABC provoca precipitação de diaminobenzidina nos núcleos das células excitadas. A única diferença entre o território espinal e o trigeminal é que a estimulação inócua não activa o c-*fos* no primeiro, fazendo-o moderadamente no segundo. Fomos, por isso, forçados a praticar cuidadosos controlos com animais intactos e estimulações inócuas, de tal forma que o resultado dos estímulos nóxicos só fosse considerado positivo quando o número de células activadas era estatisticamente superior ao das contadas nos controlos.

Os nossos resultados mostraram indubitavelmente que os estímulos dolorosos térmicos e mecânicos apenas activavam o c-*fos* nas células do subnúcleo caudal. A reacção observada na região de transição com o subnúcleo interpolar (Vi/Vc) corresponde ainda inteiramente ao subnúcleo caudal (Vc) porque o subnúcleo interpolar só aparece em cortes mais rostrais da região de transição, lateralmente ao subnúcleo caudal. Isto estava de acordo com o facto de os estímulos naturais (térmicos) no gato originarem respostas electrofisio-

lógicas limitadas a este subnúcleo (Hu e Sessle, 1984). Para explicar este nosso achado, propomos que o subnúcleo caudal tenha um limiar de excitação pelo afluxo doloroso mais baixo do que o resto do complexo trigeminal. Os outros núcleos com um limiar mais alto só dariam respostas aos estímulos eléctricos intensos, e não aos estímulos naturais. Esta hipótese não contradiz, antes completa, as ideias de Denny Brown e Yanagesawa (1973). O subnúcleo caudal não só terá um limiar mais baixo de excitação nociceptiva, como por outro lado modulará a excitação dos subnúcleos mais rostrais (Hu e Sessle, 1984), actuando depois a totalidade do complexo trigeminal na transmissão ascendente trigeminofugal que produz finalmente a percepção dolorosa tálamo-cortical. Esta hipótese, suscitada pelos dados obtidos neste trabalho com o c-*fos* necessita de comprovação electrofisiológica futura.

Devo realçar que a estimulação térmica por nós levada a cabo excitou nociceptivamente a polpa como demonstrámos através das extensas lesões observadas. Que o número de células c-*fos* activadas foi aproximadamente o mesmo que quando a polpa era mecanicamente excitada por um estilete nela introduzido (Quadro 3), reforça esta conclusão.

Reacção Pulpar às Agressões

Cárie e cavitação

Os efeitos da cárie, que ocorre como afecção espontânea no homem, têm sido frequentemente pesquisados no modelo de cavitação em V efectuado no animal de experiência. As situações são, porém, diversas na medida em que na cárie temos um processo destrutivo lento, de evolução crónica, operado por microorganismos, enquanto na cavitação existe uma violenta estimulação mecânica que se assemelha mais ao tratamento de uma cárie antes da deposição de amálgama. Se bem que sejam bem conhecidas as alte-

rações histopatológicas gerais da dentina e da polpa na cárie, as reacções dos nervos e da imunidade celular raramente têm sido abordadas no dente cariado, mas antes aceites por analogia com o que se tem observado nas cavidades experimentais.

Na cárie há por vezes episódios de dor aguda pela maior acessibilidade dos túbulos dentinários abrangidos pela lesão às agressões térmicas e químicas que activam o fluxo hidrodinâmico (Panopoulos, 1992). Por outro lado, túbulos a princípio expostos acabam por ficar obstruídos pelos detritos que se acumulam no espaço destruído, o que pode diminuir a intensidade da dor aguda (Hirvonen et al., 1992). Além disso, a inflamação de causa bacteriana que se desencadeia na polpa pode também originar a característica dor surda devida à estimulação das fibras C pulpares.

Não tem sido, como dissemos, cabalmente demonstrada nos dentes cariados humanos, a marcada proliferação ou emissão de rebentos (*sprouting*) nas fibras sensitivas, amplamente reportada por todos os investigadores que realizaram cavidades experimentais (Taylor et al., 1988; Taylor e Byers, 1990). Até os estudos que estabeleceram a hipótese de que os metabolitos bacterianos produzidos na cárie aumentavam a actividade nervosa foram obtidos em cavidades experimentais. Nas experiências de Ahlberg (1978) em que se colocaram extractos de estreptococo e de placa dentária humana em cavitações escavadas em dentes de gato, acabou por se verificar o desencadeamento de uma actividade electrofisiológica contínua no nervo alveolar. Apenas o muito recente estudo de Sakurai et al. (1999), e as nossas presentes investigações, directamente comprovam que na cárie humana ocorre, além disso, aumento da rede nervosa pulpar imunocorada para o CGRP.

As nossas observações retratam nervos em feixes muito grossos na zona subodontoblástica cujo aspecto faz lembrar o de certos feixes vásculo-nervosos presentes na zona radicular e no centro da câmara pulpar do dente normal. Dado que havia edema intersticial (Fig. 61) esse aspecto poderá simplesmente significar que o edema empurrou os nervos de encontro aos va-

sos dando um falso aspecto de feixe vásculo-nervoso. Isto não contraria o facto de haver manifesto aumento global do número de fibras CGRP-IR.

Sabe-se que a vasodilatação e o aumento do fluxo vascular pulpar, a princípio determinados pela inflamação bacteriana, são mais tarde exacerbados pela acção dos nervos sensitivos. De facto, aqueles fenómenos hiperémicos inicialmente provocados pela cavitação experimental aumentavam após estimulação do nervo alveolar inferior no gato, e diminuíam após corte dos nervos (Olgart, 1992). Como a aplicação de impulsos eléctricos ou de fortes pressões angulares à coroa (Olgart, 1992; Fazekas et al., 1992), ou ainda a introdução nas cavidades artificiais de capsaicina actuando como irritante (Liu et al., 1990), intensificam a vasodilatação, supõe-se que nos nervos subjacentes à cárie ocorram reflexos axonais, semelhantes aos estudados na pele, em que os colaterais dos nervos sensitivos estimulados a partir de uma zona hiperémica libertam SP e CGRP (Lembeck e Holzer, 1979) que por sua vez vão exacerbar a vasodilatação e consequentemente a inflamação. Observou-se recentemente que havia aumento da circulação pulpar após introdução do CGRP em cavidades profundas escavadas em dentes de animais de experiência (Ngassapa et al., 1992).

O facto de as fibras nervosas que proliferam na polpa do dente cavitado serem muito ricas em receptores ao NGF (Sakurai et al., 1999) levanta a questão da origem deste factor. O aumento da síntese de NGF demonstrada por hibridização *in situ* nos pulpócitos subjacentes aos odontoblastos lesados pela cavitação (Byers et al., 1992b), parece responder a essa interrogação.

Finalmente devemos frizar que uma parte das fibras nervosas por nós observadas ao ME na polpa por baixo da cárie, mostrava lesões estruturais moderadas com densificação axonal e desorganização parcial da baínha de mielina. Este é um aspecto que tem sido bastante esquecido. De há muito se sabia, no entanto, que em áreas de inflamação crónica do organismo ocorriam fibras mielínicas com sinais de sofrimento tais como a separação das lamelas mielínicas (Dyck et al., 1984). Em casos de exposição pulpar crónica acompanhada de pulpite ulcerativa e hiperplástica (Piskin et al., 1993) obser-

vavam-se alterações desse tipo, muito semelhantes às descritas aqui. Ignoramos se estas fibras em sofrimento são filetes neoformados ou preexistentes e se conservam a sensibilidade normal, facto a estudar no futuro em modelos experimentais com métodos electrofisiológicos.

A *cavitação experimental* tem sido, como dissemos, amplamente utilizada como modelo de cárie e nela foi pela primeira vez assinalada a proliferação das fibras sensitivas (Kimberly e Byers, 1988; Taylor e Byers, 1990; Taylor et al., 1988). Essa proliferação ocorria na parte sã da polpa que rodeava o microabcesso que se formava junto à dentina nas cavidades mais profundas. Mas nas cavidades superficiais ocorria mesmo na ausência de qualquer abcesso.

Os nossos achados não corroboram inteiramente aquelas observações. Após a execução de cavidades superficiais ou profundas, com ou sem exposição pulpar, sempre verificámos a existência de desorganização dos odontoblastos e de um infiltrado inflamatório compacto, nem sempre rico em polimorfonucleares como seria de esperar de um abcesso. Devemos ainda referir que esta inflamação é muito mais celular e circunscrita à zona subcavitária do que a inflamação mais difusa característica da polpa na cárie humana. Isto leva-nos a concluir que a cavitação difere consideravelmente do processo carial humano. Naquela existe um violento traumatismo mecânico com destruição brusca dos prolongamentos odontoblásticos e da inervação dentinária, inexistente na cárie espontânea de instalação lenta.

Nalguns dentes submetidos a escavação observámos até aspiração para a dentina de odontoblastos e pulpócitos, o que só tem sido assinalado após violentos estímulos térmicos (Byers et al., 1992a) ou dessecação brusca por jacto de ar (Seltzer e Bender, 1990). No nosso caso, utilizámos brocagem com protecção térmica pelo que o efeito constatado não foi certamente devido ao calor ou à dessecação.

Outro facto interessante é que estas alterações pulpares eram inteiramente reversíveis, com desaparecimento do infiltrado e reinervação da zona

por ele ocupada embora não tivéssemos procedido ao preenchimento da cavidade com amálgama. A única alteração residual foi a ocorrência de dentina reparadora na zona previamente ocupada pelo infiltrado, a qual não era invadida pela rede nervosa neoformada. Esta era constituída por filetes nervosos mais numerosos e ramificados do que os normais, mas jamais dispostos em feixes compactos e espessos como no caso da cárie. Dado que o edema intersticial difuso que observámos na cárie raramente ocorria na cavitação tudo leva a crer, como dissemos acima, que o aspecto peculiar da rede nervosa na cárie é em parte devido ao edema.

Ainda no domínio destas observações importa referir o aspecto imunológico. A abundância de células T, que constatámos na zona inflamada subcarial, era de esperar em face da bem conhecida presença de células apresentadoras de antigénio na polpa humana do dente cariado (Izumi et al., 1996).

Na cavitação observámos aumento apreciável das células OX6-IR, apresentadoras de antigénios, presentes nas polpas normais, as quais tanto ocorriam no interior do infiltrado inflamatório como fora dele, enquanto Okiji et al. (1996) as assinalaram apenas fora da zona inflamada. Por outro lado, tem sido observado aumento numérico de células dendríticas marcadas com o anticorpo CR3/43 contra o antigénio HLA-DR, o factor anticoagulante XIIIa ou o anticorpo 2D-15C contra o antigénio humano CD14, células essas presentes na polpa subjacente à cárie do dente humano (Sakurai et al., 1999). O aumento de células dendríticas apresentadoras de antigénio coincidia com o aumento da rede nervosa imunorreactiva para o receptor do NGF, o que levou estes autores a postular uma reacção causal entre os dois fenómenos.

Foi recentemente sugerido (Okiji et al., 1996) que os neuropeptídeos modulassem a interacção entre as células apresentadoras de antigénio e os linfócitos T que, a exemplo de outros investigadores (Hahn et al., 1989), vimos muito aumentados nos dentes cariados. Por outro lado, tem-se insistido na produção de interleucinas pelas células apresentadoras de antigénio de tipo macrofágico. Sabe-se efectivamente que a interleucina-1 induz a síntese de NGF em células não neuronais (Lindholm et al., 1987), síntese que no caso do dente

ocorre nos pulpócitos (Byers et al., 1992b). A subida da concentração de NGF naturalmente provocará a proliferação (emissão de rebentos) das fibras sensitivas cuja riqueza no receptor do NGF foi recentemente descrita (Sakurai et al., 1999).

Agressão térmica

Embora esta causa de sofrimento dentário não seja de considerar actualmente na prática clínica onde é evitada pelos mecanismos de refrigeração das brocas, ela tem muita importância na investigação odontológica pelo que diz respeito à sensibilidade dolorosa e suas vias de condução.

No presente estudo tivemos a preocupação de descrever pela primeira vez as lesões provocadas na polpa pelo contacto intermitente do molar do rato com um estilete ao rubro. Dados da literatura confirmam que os estímulos térmicos dessa intensidade excitam as fibras C da polpa (Jyväsjärvi e Kniffki, 1989; Nähri et al., 1982b).

As lesões histopatológicas não têm sido devidamente examinadas em pormenor, embora se tenha referido a ocorrência de inflamação e de sensibilização das fibras nervosas às estimulações subsequentes (Ahlberg, 1978). A ocorrência de inflamação com desorganização e sucção de odontoblastos foi por nós observada, assim como zonas de coagulação ou necrose imediata por baixo da zona estimulada. As células apresentadoras de antigénio afastavam-se da área coagulada aproximando-se da dentina.

A temperatura por nós registada na dentina durante a estimulação, 46°C, corresponde ao intervalo entre 43 e 49°C em que no incisivo do rato ocorre aumento crescente da microcirculação (Raab, 1992) e estava acima do limiar de activação electrofisiológica das fibras C, 43,8°C (Nähri et al., 1982b). Estas fibras amielínicas da polpa respondem electrofisiologicamente não só ao calor, mas também ao frio, à pressão exercida sobre a cavidade pulpar, à estimulação directa da polpa com um estilete, e à estimulação química leva-

da a cabo com aplicação de cloreto de potássio ou bradicinina (Raab, 1992). É deveras interessante que a hiperemia pulpar causada pelo estímulo térmico possa ser agravada pelo factor neurogénico, isto é intensificada pela efusão de neuropeptídeos a partir dos nervos sensitivos, uma vez que é bloqueada pela capsaicina em doses desnervantes e pelos anestésicos locais que impedem a reacção dos nervos à estimulação térmica (Raab, 1992).

O presente trabalho demonstrou finalmente que a proliferação das fibras sensitivas CGRP-IR em resultado da agressão térmica é tanto ou mais intensa do que no caso das agressões bacterianas (cárie) e mecânicas da dentina (cavitação). Enquanto as células apresentadoras de antigénio se disseminavam pela zona inflamada, as fibras nervosas aumentavam de número na polpa sã mas não penetravam naquela. Tal como na cavitação experimental ocorria finalmente restituição completa da polpa, provavelmente favorecida pelo efeito cicatrizante do CGRP.

Periodontose

A nossa pesquisa neste campo foi motivada pelos trabalhos experimentais de Kvinnsland e Kvinnsland (1990) que mostraram proliferação nervosa em dentes que sofreram movimentação ortodôntica experimental no rato. Seria natural que dentes com excesso de mobilidade em doentes periodontósicos tivessem o mesmo comportamento. Na verdade, tal não aconteceu. Nos três dentes com sensibilidade ao frio, o quadro histopatológico pulpar foi de polpa atrófica com poucos pulpócitos, discreto infiltrado inflamatório, fibrose conjuntiva e mineralizações distróficas (Seltzer e Bender, 1990). Os nervos se bem que presentes na zona radicular, eram menos abundantes na câmara pulpar apresentando sinais de sofrimento axonal e mielínico ao microscópio electrónico. Nos outros casos sem sensibilidade dolorosa, a atrofia era mais marcada, os nervos raros e de escasso calibre mas com poucos sinais de sofrimento axonal. Desta forma não encontrámos quadros de atrofia pura

contraposta a quadros puramente inflamatórios. Os dois tipos lesionais interpenetravam-se e o que de facto impressionava era a variabilidade da destruição nervosa.

Interpretámos este facto como resultante da baixa de irrigação pulpar por obstrução mais ou menos pronunciada dos canais de comunicação com o periodonto, situação usual na periodontose (Seltzer e Bender, 1990). A distrofia ocasionada na polpa deve ter-se oposto a qualquer tendência de estimulação do crescimento nervoso induzida pela excessiva mobilidade, conduzindo fatalmente à atrofia nervosa.

Em suma, os nossos achados referentes à cárie humana, à situação homóloga mas em que existe uma importante estimulação mecânica – a cavitação experimental, e à agressão térmica, configuram um denominador reactivo comum, a neoproliferação dos nervos sensitivos. A ocorrência de inflamação pulpar em todas estas situações deve ser o mecanismo inicial na cascata desencadeadora da reacção nervosa. As células apresentadoras de antigénio, atraídas pela inflamação, libertarão interleucinas que provocam o aumento da síntese de NGF nos pulpócitos, o qual actuará sobre os receptores de NGF das fibras sensitivas levando à proliferação destas.

Ocorre aqui ainda um círculo vicioso. O desencadear repetido de reflexos axonais a partir do processo inflamatório leva à libertação acrescida de neuropeptídeos que exacerbam a inflamação graças à sua propriedade hiperemiante. Mas esta é também um elemento importante na cicatrização e *restitutio ad integrum* da polpa. A normalização da estrutura pulpar na cavitação, mesmo não tratada, e na agressão térmica, por nós verificadas, pode beneficiar deste mecanismo.

Um aspecto peculiar à polpa é que os nervos simpáticos não experimentaram qualquer reacção neoformadora face às agressões que levámos a cabo, o que pode dever-se à comprovada ausência de receptores do NGF na inervação autónoma da polpa (Oswald e Byers, 1993).

Conclusões

1. A distinta estrutura fina dos odontoblastos, ricos em retículo endoplásmico rugoso, e dos pulpócitos vizinhos onde ele é escasso, tornam pouco provável a transformação dos segundos nos primeiros quando estes são destruídos pela cárie e outras agressões ao dente.
2. A maioria do colagéneo da matriz pulpar é constituída por fibras de reticulina, ou seja colagéneo do isotipo III, a que se associam algumas redes de fibras oxitalânicas com exclusão das outras fibras do sistema elástico.
3. A polpa normal tem células apresentadoras de antigénios mas escassos linfócitos B ou T. Estes e as células apresentadoras de antigénios tornam-se mais abundantes nos processos patológicos.
4. As fibras nervosas da polpa são quase todas amielínicas e mielínicas finas da classe Aδ. Enquanto as primeiras e uma parte das segundas são ricas nos neuropeptídeos CGRP e SP, o resto das mielínicas parece conter a proteína S-100. Estas fibras rareiam para fora do plexo de Raschkow e não ocorrem na dentina.
5. As fibras nervosas peptidérgicas, CGRP-IR e SP-IR, representam os axónios periféricos das células sensitivas ganglionares de tamanho pequeno e de uma fracção das de tamanho médio. As fibras S-100-IR devem provir do resto das células médias e das grandes.
6. O processamento do afluxo doloroso oriundo do dente, produzido por estímulos térmicos ou mecânicos nóxicos, ocorre primariamente no subnúcleo caudal do núcleo espinal do trigémeo, antes da provável excitação secundária dos subnúcleos mais rostrais.
7. Na cárie e na cavitação experimental da dentina ocorrem lesões muito diferentes. Enquanto na cárie há inflamação pulpar discreta e hipertrofia generalizada da rede nervosa sensitiva com as fibras dispostas em feixes grossos separados por edema intersticial, na cavitação surge inflamação muito intensa na polpa dos cornos pulpares e proliferação

nervosa apenas na polpa sã da profundidade, com cicatrização e reinervação a partir das duas semanas.

8. Na estimulação térmica nóxica do dente intacto as lesões pulpares são semelhantes mas mais intensas que na cavitação. A polpa coronal sofre coagulação seguida de infiltração linfoplasmocitária, enquanto a rede nervosa só permanece na polpa mais profunda. Segue-se reinervação pulpar e cicatrização como na cavitação.
9. As agressões externas ao dente, bacterianas (cárie), mecânicas (cavitação) ou térmicas (queimadura), provocam, além de marcada hipertrofia reaccional da rede nervosa sensitiva pulpar, hiperplasia das células apresentadoras de antigénios. É provável que as células apresentadoras de antigénios produzam interleucinas que induzam a síntese do factor de crescimento nervoso nos pulpócitos, o qual estimula a proliferação nervosa devido à abundância do seu receptor nas fibras sensitivas. Os neuropeptídeos libertados por estas possivelmente contribuem para a cicatrização final da polpa depois de eliminada a agressão.
10. Embora a hipermobilidade dentária provoque hipertrofia nervosa pulpar, nos dentes com doença periodontal há pelo contrário tendência à atrofia nervosa, provavelmente devido à deficiente irrigação da polpa.

RESUMO

Nesta tese pretendemos contribuir para o esclarecimento de alguns pontos controversos relativos à estrutura e inervação da polpa dentária. Dentes humanos de pacientes adultos, sãos ou portadores de lesões, na sua maioria molares e alguns incisivos e caninos, assim como molares de rato, intactos ou sujeitos a estimulação experimental, foram preparados de duas maneiras. Nuns casos, os dentes, sobretudo humanos, eram seccionados verticalmente e a polpa extraída e fixada. Noutros casos, maioritariamente no rato, o dente era fixado e descalcificado. A polpa isolada ou o dente descalcificado eram incluidos em parafina caso a fixação tivesse sido efectuada em líquido de Bouin e os cortes tratados por colorações histológicas de rotina. A fixação em paraformaldeído efectuou-se por imersão do dente ou, no rato, por perfusão intracardíaca do animal, após o que cortes de congelação serviam para imunocolorações. Fixações por perfusão do animal ou imersão da polpa na mistura de paraformaldeído-glutaraldeído de Karnowsky destinaram-se a processamento ulterior para microscopia electrónica. Os dentes humanos lesados eram portadores de cárie ou periodontose. Os dentes de rato sujeitos a experimentação, sofreram cavitação ou estimulação térmica nóxica por contacto com uma agulha aquecida ao rubro. No caso desta estimulação estudou-se também a activação pela dor do protooncogene c-*fos* no complexo trigeminal do tronco cerebral. Ainda em molares de rato depositou-se o traçador neuronal CTb na polpa e estudou-se a sua migração retrógrada para as células sensitivas do gânglio semilunar.

O exame histológico da polpa normal e respectiva interface com a dentina, centrou-se na citologia dos pulpócitos e odontoblastos, fibras conjuntivas do estroma pulpar, organização dos feixes vásculo-nervosos, e imunocoloração de linfócitos B e T e células apresentadoras de antigénio. A distribuição da rede nervosa e o tipo de fibras nervosas em causa foram estudados por meio da imunocoloração da proteína S-100 marcadora das fibras sensitivas mielínicas, dos neuropeptídeos CGRP e SP marcadores de fibras sensitivas mielínicas finas e amielínicas, e dos neuropeptídeos NPY e VIP marcadores de fibras autónomas. O calibre das fibras nervosas mielínicas foi medido nas

microfotografias electrónicas. Nos dentes humanos com cárie ou periodontose e nos molares de rato submetidos a estímulos nóxicos aplicaram-se as mesmas técnicas. Os cortes do núcleo do trigémeo de animais, cujos dentes foram sujeitos a estímulos térmicos e mecânicos nóxicos, foram imunocorados para identificação da proteína Fos. No gânglio semilunar de ratos normais com injecção intrapulpar do traçador neuronal CTb, os cortes foram duplamente imunocorados para CTb e CGRP ou CTb e SP.

Obtiveram-se os seguintes resultados:

1. A organização histológica e a inervação da polpa e dentina eram semelhantes no dente humano e do rato.
2. A maioria dos pulpócitos (90%) era do tipo fibrocítico e apenas 10% do tipo fibroblástico secretório, fosse qual fosse a sua localização, o que não é a favor da metaplasia dos pulpócitos da camada celular da polpa em odontoblastos quando estes são destruídos.
3. A matriz extracelular pulpar continha fibras de reticulina mais abundantes à volta dos vasos e nervos; as fibras de colagéneo limitavam-se ao interior dos feixes vásculo-nervosos. Quanto às fibras do sistema elástico, apenas ocorriam algumas fibras oxitalânicas associadas às fibrilas colagéneas de reticulina.
4. A polpa normal tinha escassos linfócitos B ou T e abundantes células apresentadoras de antigénios imunocoradas pelo anticorpo OX6.
5. Os fascículos nervosos nos feixes vásculo-nervosos tinham baínha perineural do tipo fibroblástico sem lâmina basal.
6. A quase totalidade das fibras mielínicas pulpares exibia calibre inferior a 5 μm pelo que devem pertencer ao grupo neurofisiológico Aδ. As fibras amielínicas e uma parte das mielínicas eram imunorreactivas para o CGRP e a SP e as únicas que abundavam para fora do plexo de Raschkow e que penetravam (as amielínicas) na dentina. As restantes

fibras mielínicas eram imunorreactivas para a proteína S-100; não penetravam na dentina e aguardam caracterização neuroquímica mais completa.

7. Após injecção pulpar do traçador neuronal estável CTb, apareciam marcadas no gânglio semilunar células sensitivas pequenas, médias e grandes. Apenas as células pequenas e algumas médias eram imunor--reactivas para o CGRP e a SP, dando origem ao contingente de fibras nervosas pulpares que contêm os dois neuropeptídeos. O resto das células de tamanho médio e as células grandes devem dar origem às fibras Aδ pulpares imunorreactivas para o S-100 mas desprovidas de neuropeptídeos.
8. O subnúcleo caudal do trigémeo foi a única parte do complexo trigeminal bulbar em que se verificou activação do protooncogene c-*fos* pelos estímulos dentários térmicos e mecânicos nóxicos. Isto sugere que o subnúcleo caudal tenha limiar mais baixo de excitação pelo afluxo doloroso do que os subnúcleos mais rostrais, que lhe permita modular o processamento da dor nestes.
9. Na cárie ocorria inflamação da polpa superficial rica em linfócitos T, e marcada proliferação de fibras nervosas sensitivas CGRP–IR, dispostas em feixes grossos. Alguns nervos exibiam sinais de sofrimento axonal e desorganização da mielina.
10. Nos casos de periodontose onde havia excesso de mobilidade dentária que no animal de experiência propicia a proliferação nervosa, observou-se pelo contrário atrofia da rede nervosa, sobretudo na polpa coronal. Isto pode ser devido a deficiente irrigação pulpar causada por obstrução dos canais de comunicação com o periodonto, que contrariaria a tendência para a proliferação nervosa devida à hipermobilidade do dente.
11. Na cavitação experimental em V, com ou sem exposição pulpar, a inflamação era muito mais intensa e focalizada do que na cárie, abrangendo todo o corno pulpar enquanto na polpa sã do colo pulpar havia

proliferação nervosa intensa. As células apresentadoras de antigénio encontravam-se aumentadas de número no foco inflamatório e na polpa sã. Dava-se depois a reconstituição total da polpa e sua reinervação.

12. A estimulação térmica nóxica do dente, com elevação da temperatura pulpar para 46°C durante 30 segundos, ocasionou coagulação da polpa subjacente. A zona coagulada era seguidamente ocupada por infiltrado inflamatório, enquanto os nervos sensitivos na polpa sã da profundidade proliferavam activamente. Finalmente ocorria cicatrização total da polpa com reconstituição da rede sensitiva.
13. Em conclusão, a proliferação dos nervos e a chegada de células apresentadoras de antigénios ocorrem na polpa em resposta a todas as lesões devidas a agressão externa ao dente. É provável que as células apresentadoras de antigénios segreguem interleucinas que induzam a síntese do factor de crescimento nervoso nos pulpócitos actuando nos seus receptores que abundam nas fibras nervosas sensitivas. Os neuropeptídeos libertados pelas fibras sensitivas poderão favorecer a cicatrização pulpar.

SUMMARY

In this thesis we seek to throw some light on several points related to the structure and innervation of the dental pulp. Human teeth, intact or lesioned, from adult patients, mostly molar and some incisive and canine, as well as rat molar teeth, intact or subject to experimental stimulation, were prepared in two different ways. Some of them, mainly human teeth, were sectioned vertically and the pulp detached and fixed. Alternatively, mostly in the rat, teeth were fixed in block and decalcified. The isolated pulp or the decalcified teeth were paraffin embbeded when the fixative was Bouin's fluid and stained by routine histological procedures. When the teeth were fixed in paraformaldehyde by immersion or by perfusion (in the rat) they were frozen cut and the sections were immunostained. Fixation was carried out in the paraformaldehyde-glutaraldehyde mixture of Karnovsky if the material was intended for ultrastructural study. Lesioned human teeth suffered from caries or periodontal disease. Rat teeth were subjected to cavitation in V or noxic thermal stimulation by contact with a red-heated needle. After thermal stimulation, the activation of the protooncogene c-*fos* was searched in the whole trigeminal nuclear bulbar complex. Still in rat molars, the stable neuronal tracer CTb was deposited in the pulp to follow its retrograde migration toward the sensory cells of the semilunar trigeminal ganglion.

The histological study of the normal pulp and its dentinal interface dealt with the cytology of pulpocytes and odontoblasts, the connective tissue fibers of the pulpar stroma, the organization of neurovascular bundles and the immunostaining of lymphocytes B and T and antigen presenting cells. The distribution of the nervous plexuses and the type of nervous fibers were studied by means of immunostaining for protein S-100, a marker of sensory myelinated fibers, the neuropeptides CGRP and SP, markers of sensory amyelinated and fine myelinated fibers, and the neuropeptides NPY and VIP, markers of autonomic fibers. The structure and caliber of the nervous fibers were examined in the electron microscope. Human teeth with caries or periodontal disease, and rat molar teeth submitted to cavitation or noxious heat were treated with those same techniques. Sections of the trigeminal nuclear

complex from rats whose teeth underwent noxious thermal and mechanical stimulation were immunostained for the Fos-protein. Sections of the semilunar ganglion of rats, after intrapulpar injection of the neuronal tracer CTb, were double immunostained for CTb and CGRP or CGRP and SP.

The following data were obtained:

1. The histological organization and innervation of the pulp were similar in human and rat teeth.
2. Most pulpocytes (90%) were of the fibrocytic mature type and only 10% encompassed the fibroblastic immature type, whatever their location in the pulp, which does not favour metaplasia of pulpocytes of the cellular layer into odontoblasts when the latter are destroyed.
3. The pulpar extracelllular connective matrix contained reticular fibers more abundant around blood vessels and nerves, and no collagen fibers which were confined to the interior of neurovascular bundles. No fibers of the elastic system occurred except some fine networks of oxytalan fibers associated to collagen reticular fibrils.
4. The normal pulp had scarce B or T lymphocytes and abundant antigen presenting cells immunostained by OX6 antibody.
5. Nervous fasciculi in neurovascular bundles had perineural sheaths of the fibroblastic type without basal lamina.
6. Most pulpar myelinated fibers were less than 5 μm in caliber, thus belonging to the Aδ neurophysiological type. Unmyelinated and some myelinated fibers were immunoreactive for CGRP and SP, and they were the only ones occurring to the outer side of the Raschkow plexus and penetrating the dentin. The remaining myelinated fibers were S-100 immunoreactive, did not get into the dentine and await further neurochemical characterization.

7. Pulpar nervous fibers, labeled with the stable neuronal tracer CTb, arose from sensory ganglion cells of all sizes. However only the small and part of the medium-sized cells were immunoreactive for CGRP or SP giving rise to the neuropeptide containing dental nerve fibers. The remaining medium-sized and the large ganglion cells should give rise to the S-100 immunoreactive myelinated pulpar fibers.
8. The caudal subnucleus was the only component of the trigeminal nuclear bulbar complex in which there was activation of the protooncogene c-*fos* following dental thermal or mechanical noxious stimulation. It is suggested that the caudal subnucleus has a lower excitation threshold by noxious input than the rostral subnuclei, which may facilitate modulation of the excitation of the latter by the caudal subnucleus
9. In caries there was inflammation of the subjacent pulp rich in T lymphocytes and marked hypertrophy of CGRP-IR fibers forming thick bundles. Some fibers exhibited signs of axonal suffering and myelin distortion.
10. In teeth with periodontal disease and hypermobility, the latter a condition favoring nervous sprouting in the experimental animal, there was however atrophy of the nervous plexus, mainly in the coronal pulp. This is suggestive that bad irrigation due to obstruction of the canals connecting the pulp with the periodontal ligament prevent nerve proliferation, rather leading to nerve degeneration.
11. In experimental cavitation in V, with or without pulp exposure, pulpar inflammation was much stronger and confined to the pulpar horns than in caries. An increased number of antigen presenting cells occurred in the inflamed zone and in the underlying sound pulp. In the latter there was intense nerve sprouting. This was followed by complete healing and reinnervation of the entire pulp.
12. Thermal noxious stimulation of the tooth leading to an increase of pulpar temperature to 46°C for 30 sec., provoked coagulation of the

underlying pulp. The changed pulpar area was replaced by an inflammatory infiltrate, while in the deep sound tissue nerve sprouting occurred together with an increased amount of antigen presenting cells. The entire pulp then became normal.

13. In conclusion, nerve sprouting and arrival of antigen presenting cells occur in the pulp in response to all lesions due to external aggression. It is likely that antigen presenting cells produce interleukins which may induce nerve-growth-factor synthesis in pulpocytes acting on receptor sites occurring in sensory nerve fibers. Neuropeptides released by the sensory fibers are likely to further the final healing of the pulp.

BIBLIOGRAFIA

Ahlberg, K,F. – Functional studies on experimentaly induced inflammatory reactions in the feline tooth pulp. Thesis, Karolinska Institutet, Estocolmo, 1978.

Anton, F., Herdegen, T., Peppel, P. e Leal, J.D. – c-Fos-like immunoreactivity in rat brainstem neurons following noxious chemical stimulation of the nasal mucosa. Neuroscience 41: 629-641, 1991.

Arvidsson, J. – Location of cat trigeminal ganglion cells innervating dental pulp of upper and lower canines studied by retrograde transport of horseradish peroxidase. *Brain Res.* **99:** 135-139, 1975.

Arvidsson, J. e Gobel, S. – An HRP study of the central projections of primary trigeminal neurons which innervate tooth pulps in the cat. *Brain Res.* **210:** 1-16, 1981.

Avelino, A. e Cruz, F. – Peptide immunoreactivity and ultrastructure of the rat urinary bladder nerve fibers after topical desensitization by capsaicin or resiniferatoxin. *Auton. Neurosci.: Basic and Clinical* **86**: 58-67, 2000.

Avery, J.K. – Pulp. *In: Orban's oral histology and embryology* (ed. Bhaskar, S.N.), pp. 139-179. Mosby Year Book, S. Luís, 1991.

Avery, J.K. e Chiego Jr., D.J. – The cholinergic system and the dental pulp. In: *Dynamic aspects of dental pulp* (eds. Inoki, R., Kudo, T. e Olgart, L.M.) pp: 297-331, Chapman e Hall, Londres, 1990.

Avery, J.K., Cox, C.F. e Chiego Jr., D.J. – Presence and location of adrenergic nerve endings in the dental pulps of mouse molars. *Anat. Rec.* **198:** 59-71, 1980.

Baba, T., Takagi, M. e Yagasaki, H. – Ultrastructural cytochemistry of carbohydrates in microfibrils associated with the amorphous elastin in the monkey aorta. *Anat. Rec.* **213:** 385-393, 1985.

Baume, L.J. - The biology of pulp and dentine. In: *Monographs in Oral Science* **8**, Karger, Basileia, 1980.

Bernick, S.L. – Innervation of the human tooth. *Anat. Rec.* **101:** 81-107, 1948.

Bishop, M.A. – A fine-structural survey of the pulpal innervation in the rat mandibular incisor. *Am. J. Anat.* **160:** 213-229, 1981.

Bjurholm, A., Kreicbergs, A., Schultzberg, M. e Lerner, V.H. – Neuroendocrine regulation of cyclic AMP formation in osteoblastic cell lines (UMR-106-01, Ros 17/28, MC 373-E1 and Saos-2) and primary bone cells. *J. Bone Miner. Res.* **7:** 1011-1019, 1992.

Bradamante, Z., Pecina-Hrncevic, A., e Ciglar, I. – Oxytalan fibers in human dental pulps. *Experientia* **36:** 1210-1211, 1980.

Brännström, M. – The hydrodynamic theory of dentinal pain sensation in preparations, caries and the dentinal crack. *J. Endod.* **12:** 453-457, 1986.

Brashear, A.D. – The innervation of the teeth. *J. Comp. Neurol.* **64:** 169-185, 1936.

Brodal, A. – Os nervos cranianos. Anatomia e Correlações anátomo-clínicas, 2ª ed. Lopes da Silva, Porto, 1974.

Brown, L. R. e Lefkowitz, W. – Influences of dentinal fluids on experimental caries. *J. Dent. Res.* **45:** 1493, 1966.

Byers, M.R. – Dental sensory receptors. *Int. Rev. Neurobiol.* **25:** 39-94, 1984.

Byers, M.R., Swift, M.L. e Wheeler, E.F. – Reactions of sensory nerves to dental restorative procedures. *Proc. Finn. Dent. Soc.* **88** Suppl. I: 73-82, 1992a.

Byers, M.R., Wheeler, E.F. e Bothwell, M. – Altered expression of NGF and P75 NGF-receptor by fibroblasts of injured teeth precedes sensory nerve sprouting. *Growth Factors* **6:** 41-52, 1992b.

Casasco, A., Calligaro, A., Casasco, M., Menghini, P., Marchetti, C., Poggi, P., Springall, D.R. e Polak, J.M. – Immunocytochemical detection of protein p38 in human dental pulp. *Archs. Oral Biol.* **35:** 685-688, 1990.

Casasco, A., Calligaro, A., Casasco, M., Springall, D.R., Polak, J.M. e Marchetti, C. – Immunocytochemical evidence for the presence of somatostatin-like immunoreactive nerves in human dental pulp. *J. Dent. Res.* **70:** 87-89, 1991.

Casasco, A., Frattini, P., Casasco, M., Santagostino, G., Springall, D.R., Kuhn, D.M. e Polak, J.M. – Catecholamines in human dental pulp. A combined immunohistochemical and chromatographic study. *Eur. J. Histochem.* **39:** 133-140, 1995.

Chen, S.B., Murray, A., Segal, R.A., Bushnell, M. A. e Walsh, M. – Studies on intracellular LETS glycoprotein matrices. *Cell* **14:** 377-391, 1978.

Chiego Jr., D.J. – An ultrastructural and autoradiographic analysis of primary and replacement odontoblasts following cavity preparation and wound healing in the rat molar. *Proc. Finn. Dent. Soc.* **88** Suppl. I: 243-256, 1992.

Clements, J.R., Magnusson, K.R., Hautman, J. e Beitz, A.J. – Rat tooth pulp projections to spinal trigeminal subnucleus caudalis are glutamate-like immunoreactive. *J. Comp. Neurol.* **309:** 281-288, 1991.

Cohen, E.S. e Calkins, A. – Electron microscopic observations on a fibrous component of amyloid of diverse origins. *Nature* **183:** 1202-1203, 1959.

Cotta-Pereira, G., Guerra Rodrigo, F. e David-Ferreira, J.F. – Comparative study between the elastic system fibers in human skin and thick skin. *Biol. Cellul.* **31**: 297-302, 1978.

Denny-Brown, D. e Yanagesawa, N. – The function of the descending root of the fifth nerve. *Brain* **96:** 783-814, 1973.

Dong, W.K., Chudler, E. H. e Kawakami, Y. – Tooth pulp-evoked potentials in the trigeminal brainstem nuclear complex. *Brain. Res.* **529:** 131-142, 1990.

Dong, W.K., Shiwaku, T., Kawakami, Y. e Chudler, E.H. - Static and dynamic responses of periodontal ligament mechanoreceptors and intradental mechanoreceptors. *J. Neurophysiol.* **69:** 1567-1582, 1993.

Dörscher-Kim, J e Kim, S. – The adrenergic system and dental pulp. In: *Dynamic aspects of dental pulp* (eds. Inoki, R., Kudo, T. e Olgart, L.M.) pp: 283-296, Chapman e Hall, Londres, 1990.

Dyck, P.J., Thomas, P.K., Lambert, E.H. e Bunge, R. – Peripheral neuropathy, W. B. Saunders, Filadélfia, pp. 760-870, 1984.

Edwald, L. e Scott Jr., D. – Influence of changes in microcirculation on the excitability of the sensory unit in the tooth of the cat. *Acta Physiol. Scand.* **82:** 555-556, 1971.

Ericson, H. e Blomqvist, A. - Tracing of neuronal connections with cholera toxin subunit B: light and electron microscopic immunohistochemistry using monoclonal antibodies. *J. Neurosci. Meth.* **24:** 225-236, 1988.

Fazekas, A., Györfi, A., Irmes, F. e Rosivall, L. – Effect of substance P administration on vascular permeability in the rat dental pulp and submandibular gland. *Proc. Finn. Dent. Soc.* **88** Suppl. I: 481-486, 1992.

Fearnhead, R.W. – Histological evidence for the innervation of human dentin. *J. Anat.* **91:** 267-277, 1957.

Fitzgerald, M. – Cellular mechanisms of dentinal bridge repair using 3H-thymidine. *J. Dent. Res.* **58:** 2198-2206, 1979.

Frank, R.M. – Attachment sites between the odontoblast process and the intradental nerve. *Archs. Oral Biol.* **13:** 833-834, 1968.

Fried, K. e Risling, M. – Nerve growth factor receptor-like immunoreactivity in primary and permanent canine tooth pulps of the cat. *Cell Tissue Res.* **264:** 321-328, 1991.

Fried., K., Arvidsson, J., Robertson, B., Brodin, E. e Theodorsson, E. – Combined retrograde tracing and enzyme immunohistochemistry of trigeminal ganglion cell bodies innervating tooth pulps in the rat. *Neuroscience.* **33:** 101-109, 1989.

Fristad, I., Heyeraas, K.J. e Kvinnsland, I.H. – Neuropeptide Y expression in the trigeminal ganglion and mandibular division of the trigeminal nerve after inferior alveolar nerve axotomy in young rats. *Exp. Neurol.* **142:** 276-286, 1996.

Fristad, I., Jacobsen, E.B. e Kvinnsland, I. – Coexpression of vasoactive intestinal polypeptide and substance P in reinnervating pulpal nerves and in trigeminal ganglion neurons after axotomy of the inferior alveolar nerve in the rat. *Archs. Oral Biol.* **43:** 183-189, 1998.

Gabella, G. e Davis, C. – Distribution of afferent axons in the bladder of rats. *J. Neurophysiol.* **27:** 141-155, 1998.

Gazelius, B., Brodin, L. e Olgart, L. – Depletion of substance P-like immunoreactivity

in the cat dental pulp by antidromic nerve stimulation. *Acta Physiol. Scand.* **111:** 319-327, 1981.

Gibbins, I.L., Furness, J.B., Costa, M, MacIntyre, I., Hillyard, C.J. e Girgis, S. – Co-localization of calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivity with substance P in cutaneous, vascular and visceral sensory neurons of guinea pigs. *Neurosci. Lett.* **57:** 125-130, 1985.

Gibson, S.J., McGrossan, M.V. e Polak, J.M. – Calcitonin gene-related peptide (CGRP) immunoreactive cells contain substance P (SP), somatostatin (SOM) or galanin (GAL) immunoreactivity in pig dorsal root ganglia. *Reg. Peptides* **13:** 68, 1985.

Gobel, S. e Binck, J.M. – Degenerative changes in primary trigeminal axons and in neurons in nucleus caudalis following tooth pulp extirpations in the cat. *Brain Res.* **132:** 347-354, 1977.

Gunji, T. – Morphological research on the sensitivity of dentin. *Arch. Histol. Jap.* **45:** 45-67, 1982.

Haglid, K., Hamberger, A., Hansson, H.-A., Hyden, H., Persson, L. e Ronnback, L. – S-100 protein in synapses of the central nervous system. *Nature* **251:** 532-534, 1974.

Hahn, C.-L., Falkler, W.A. e Siegel, M.A. – A study of T and B cells in pulpal pathosis. *J. Endod.* **15:** 20-26, 1989.

Han, S.S., Avery, J.K. e Hale, L.E. – The fine structure of differentiating fibroblasts in the incisor pulp of the guinea pig. *Anat. Rec.* **153:** 161-184, 1965.

Hay, E.D. – Fine structure of embryonic masses and their relation to the cell surface in ruthenium red-fixed tissues. *Growth* **42:** 390-423, 1978.

Hensel, H. e Mann, G. – Temperaturschmerz und Wärmeleitung in menschlichen Zahn. *Stoma* **9:** 76, 1956.

Heyeraas, K.J. e Kvinnsland, I. – Tissue pressure and blood flow in pulpal inflammation. *Proc. Finn. Dent. Soc.* **88** Suppl. I: 393-401, 1992.

Heyeraas, K.J., Kvinnsland, I., Byers,, M.R. e Jacobsen, E.B. – Nerve fibers

immunoreactive to protein gene product 9.5, calcitonin gene-related peptide, substance P, and neuropeptide Y in the dental pulp, periodontal ligament and gingiva in cat. *Acta Odontol. Scand.* **51:** 207-221, 1993.

Hirvonen, T., Ngassapa, D. e Nähri, M. – Relation of dentin sensitivity to histological changes in dog teeth with exposed and stimulated dentin. *Proc. Finn. Dent. Soc.* **88** Suppl. I: 133-141, 1992.

Hökfelt, T., Kellerth, J.-O., Nilsson, G. e Pernow, P. – Experimental immunohistochemical studies on the localization and distribution of substance P in cat primary sensory neurons. *Brain Res.* **100:** 235-252, 1975.

Horiuchi, H. e Matthews, B. – In vitro observation on fluid flow through human dentine caused by pain-producing stimuli. *Archs. Oral Biol.* **118:** 275, 1973.

Hu, J.W. e Sessle, B.J. – Comparison of responses of cutaneous nociceptive and nonnociceptive brain stem neurons in trigeminal subnucleus caudalis (medullary dorsal horn) and subnucleus oralis to natural and electrical stimulation of tooth pulp. *J. Neurophysiol.* **52:** 39-53, 1984.

Hu, J.W., Dostrowsky, J.O. e Sessle, B.J. – Functional properties of neurons in cat trigeminal subnucleus caudalis (medullary dorsal horn). I. Responses to oral-facial noxious and nonnoxious stimuli and projections to thalamus and subnucleus oralis. *J. Neurophysiol.* **45:** 173-192, 1981.

Hunt, S.P., Pini. A. e Evan, G. – Induction of c-*fos*-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. *Nature* **328:** 632-634, 1987.

Ichikawa, H. Deguchi, T., Nakago, T., Jacobowitz, D.M. e Sugimoto, T.- Parvalbumin and calretinin-immunoreactive trigeminal neurons innervating the rat molar tooth pulp. *Brain Res.* **679:** 205-211, 1995.

Ichikawa, H., Deguchi, T., Fujiyoshi, Y., Nakago, T., Jacobowitz, D.M. e Sugimoto, T. – Calbindin-D 28k-immunoreactivity in the trigeminal ganglion neurons and molar tooth pulp of the rat. *Brain Res.* **715:** 71-78, 1996.

Ichikawa, H., Jacobowitz, D.M. e Sugimoto, T. – S-100 protein-immunoreactive primary sensory neurons in the trigeminal and dorsal root ganglia of the rat. *Brain Res.* **748:** 253-257, 1997.

Ikeda, H., Tokita, Y. e Suda, H. – Capsaicin-sensitive Aδ fibers in cat tooth pulp. *J. Dent. Res.* **76:** 1341-1349, 1997.

Izumi, T., Kobayashi, I., Okamura, K., Matsuo, K., Kiyoshima, T., Ishibashi, Y., Inoue, H. e Sakay, H. – An immunohistochemical study of HLA-DR and a1-antichymotrypsin-positive cells in the pulp of human non-carious teeth. *Archs. Oral Biol.* **41:** 627-630, 1996.

Jackson, D.L. e Hargreaves, K.M. – Activation of excitatory amino acid receptors in bovine dental pulp evokes the release of iCGRP,. *J. Dent. Res.* **78:** 54-60, 1999.

Jacobsen, E.B. e Heyeraas, K. J. – Effect of capsaicin treatment or inferior alveolar nerve resection on dentine formation and calcitonin gene-related peptide- and substance P-immunoreactive nerve fibers in rat molar pulp. *Archs. Oral Biol.* **41:** 1121-1131, 1996.

Jancsó, N., Jancsó-Gabor, A. e Szolcsányi, J. – The role of sensory nerve endings in neurogenic inflammation induced in human skin and in eye and paw of the rat. *Brit. J. Pharmacol.* **33:** 32-41, 1968.

Johnsen, D.C. – Innervation of teeth: qualitative, quantitative and developmental assessment. *J. Dent. Res.* **64:** 555-563, 1985.

Johnsen, D.C. – Innervation of teeth; developmental aspects. In: *Dynamic aspects of dental pulp* (eds. Inoki, R., Kudo, T. and Olgart, L.M.), pp. 3-28. Chapman e Hall, Londres. 1990.

Jones, T. e Anderson, K.V. – Functional and anatomical properties of axons innervating maxillary teeth. *J. Dent. Res.* 61: 197, 1982

Jontell, M., Okiji, T., Dahlgren, U. e Bergenholtz, G. – Immune defense mechanisms of the dental pulp. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* **9:** 179-200, 1998.

Jyväsjärvi, E. e Kniffki, K.D. – Afferent C fiber innervation of cat tooth pulp: confirmation by electrophysiological methods. *J. Physiol.* **411:** 663-675, 1989.

Kettering, J.D. e Torabinejad, M. – Microbiology and immunology. In: *Pathways of the pulp* (eds. Cohen, S. and Burns, R.C.) pp. 363-376, Mosby, S. Luís, 1994.

Khayyat, G.F., Yu, Y.J. e King, R.B. – Response patterns to noxious and non-noxious stimuli in the rostral trigeminal relay nuclei. *Brain Res.* **97:** 47-60, 1975.

Kim, S. – Neurovascular interactions in the dental pulp in health and inflammation. *J. Endod.* **16:** 48-53, 1990.

Kimberly, C.L. e Byers, M.R. – Inflammation of rat molar pulp and periodontium causes increased calcitonin gene related peptide and axonal sprouting. *Anat. Rec.* **222:** 289-300, 1988.

Kishi, Y. e Takahashi, K. – Change of vascular architecture of dental pulps with growth. In: *Dynamic aspect of dental pulp* (eds. Inoki, R., Kudo, T. e Olgart, L.M.), pp. 97-130. Chapman e Hall, Londres. 1990.

Kuboki, Y., Liu, C-F. e Fusayama, T. – Mechanism of differential spanning in carious dentin. *J. Dent. Res.* **52:** 713, 1983.

Kvinnsland, I. e Heyeraas, K.J. – Effect of traumatic occlusion on CGRP and SP immuno-reactive nerve fibre morphology in rat molar pulp and periodontium. *Histochemistry* **97:** 111-126, 1992.

Kvinnsland, I. e Kivinnsland, S. – Changes in CGRP-immunoreactive nerve fibers during experimental tooth movement in rats. *Eur. J. Orthod.* **12:** 320-329, 1990.

Lee, K.H., Chung, K.,, Chung, J.M. e Coggeshall, R.M.- Correlation of cell body size, axon size, and signal conduction velocity for individually labelled dorsal root ganglion cells in the cat. *J. Comp. Neurol.* **243:** 335-346, 1986.

Lembeck, F. – Sir Thomas Lewis' nocifensor system, histamine and substance P-containing primary afferent nerves. *Trends Neurosci.* **6:** 106-108, 1983.

Lembeck, F. e Holzer, P. – Substance P as neurogenic mediator of antidromic vasodilation and neurogenic plasma extravasation. *Naunyn Schmiedbergs Arch. Pharmacol.* **310:** 175-183, 1979.

Light, A.R. e Perl., E.R. – Re-examination of the dorsal root projection to the spinal dorsal horn including observations on the differential termination of coarse and fine fibers. *J. Comp. Neurol.* **210:** 357-375, 1982.

Lilja, J. – Innervation of different parts of the predentin and dentin in young human premolars. *Acta. Odontol. Scand.* **37:** 339-346, 1979.

Lillie, R.D. – Histopathologic Technic and Practical Histochemistry, McGraw-Hill, Nova Iorque, 1965.

Linde, A. – Glycosaminoglycans of the dental pulp. A biochemical study. *Scand. J. Dent. Res.* **81:** 177-201, 1973.

Lindholm, D., Heumann, R., Meyer, M. e Thoenen, H. – Interleukin-1 regulates synthesis in non-neuronal cells of rat sciatic nerve. *Nature* **330:** 658-659, 1987.

Liu, M., Kim, S., Park, D.S., Markowitz, K., Bilotto, G. e Dörscher-Kim, J. – Comparison of the effects of intra-arterial and locally applied vasoactive efects on pulpal blood flow in dog canine teeth determined by laser Doppler velocimetry. *Archs. Oral Biol.* **35:** 405-410, 1990.

Ljungdahl, A., Hökfelt, T. e Nilsson, G. – Distribution of substance P-like immunoreactivity in the central nervous system of the rat - I: Cell bodies and nerve terminals. *Neuroscience* **3:** 861-943, 1978.

Lu, W.X. e Haber, S.N. – In situ hybridization histochemistry – a new method for processing material stored for several years. *Brain Res.* **578:** 155-160, 1992.

Lumsden, A.G.S. – Tooth morphogenesis: contributions of the cranial neural crest in mammals. In: *Tooth morphogenesis and differentiation* (eds. Belcourt, A. B. e Ruch, J.V.), Colloque INSERM, Paris, **125:** 29-40, 1985.

Lundberg, J.M. e Hökfelt, T. – Multiple co-existence of peptides and classical transmitters in peripheral autonomic and sensory neurons - functional and pharmacological implications. In: *Progress in Brain Res.* (eds. Hökfelt, T., Fuxe, K. e Pernow, B.), **68:** 241-262, Elsevier, Amsterdão, 1986.

Lundberg, J.M., Terenius, L., Hökfelt, T., Martling, C., Takemoto, K., Mutt, V., Polak, J.M., Bloom, S e Goldstein, M – Neuropeptide Y (NPY)-like immunoreactivity in peripheral noradrenergic neurons and effects of NPY on sympathetic function. *Acta Physiol. Scand.* **116:** 477-480, 1982.

Luthman, J., Luthman, D. e Höckfelt, T. – Occurrence and distribution of different neurochemical markers in the human dental pulp. *Archs. Oral Biol.* **37:** 193-208, 1992.

Luukko, K. – Immunohistochemical localization of nerve fibers during development of embryonic rat molar using peripherin and protein gene product 9.5 antibodies. *Archs. Oral Biol.* **42:** 189-195, 1997.

Maeda, I., Honma, S. e Takano, Y. – Dense innervation of human radicular dental pulp as revealed by immunocytochemistry for protein gene product 9.5. *Archs. Oral Biol.* **39:** 563-568, 1994.

Magloire, H., Bouvier, M e Joffre, A. – Odontoblast reponse under carious lesions, In: *Proc. Finn. Dent. Soc.* **88** Suppl 1: 257-274, 1992.

Magloire, H., Joffre, A. e Hartmann, D.J. – Localization and synthesis of type III collagen and fibronectin in human reparative dentine. *Histochemistry* **88:** 141-149, 1988.

Marfurt, C.F. e Turner, D.F. – The central projections of tooth pulp afferent neurons in the rat as determined by the transganglionic transport of horseradish peroxidase. *J. Comp.Neurol.* **223:** 535-547, 1984.

Matthews, B. e Robinson, P.P. – The course of postganglionic sympathetic fibres distributed with the trigeminal nerve in the cat. *J.Physiol.* **303:** 391-401, 1980.

McGrath, P.A., Gracely, R.H., Dubner, R. e Heft, K.-D. – Non-pain and pain sensations evoked by tooth pulp stimulation. *Pain* **15:** 377-388, 1983.

Nagy, J.I., Hunt, S.P., Iversen, L.L.. e Emson, P.C. – Biochemical and anatomical observations on the degeneration of peptide containing primary afferent neurons after neonatal capsaicin. *Neuroscience* **6:** 1923-1934, 1981.

Nähri, M.V.O. – The characteristics of intradental sensory units and their responses to stimulation. *J. Dent. Res.* **64:** 564-571, 1985.

Nähri, M.V.O. – The neurophysiology of the teeth. *Dental. Clin. North Amer.* **34:** 439-448, 1990.

Nähri, M.V.O., Hirvonen, T. J., e Hakumäki, M.O.K. – Activation of intradental nerves in the dog to some stimuli applied to the dentine. *Archs. Oral Biol.* **27:** 1053-1058, 1982a.

Nähri, M., Jyväsjärvi, E., Hirvonen, T. e Huopaniemi, T. – Activation of heat-sensitive nerve fibers in the dental pulp of the cat. *Pain* **14:** 317-326, 1982b.

Nair, P.N.R. – Neural elements in dental pulp and dentin. In: *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* **80:** 710-719, Mosby Year Book, 1995.

Nair, P.N.R., Luder, H.U. e Schroeder, H.E. – The number and size-spectra of myelinated nerves in human premolars. *Anat. Embryol.* **92:** 123-128, 1992.

Newbrun, D. – Sugar and dental caries: a review of human studies. *Science* **217:** 418-423, 1982.

Ngassapa, D., Nähri, D. e Hirvonen, T. – Effect of serotonin (5-HT) and calcitonin gene-related peptide (CGRP) on the function of intradental nerves in the dog. *Proc. Finn. Dent. Soc.* **88** Suppl. I: 133-142, 1992.

Nilsson, J., von Euler, A.M. e Dalsgaard, C.J. – Stimulation of connective tissue cell growth by substance P and substance K. *Nature* **315:** 61-63, 1985.

Obrink, B. – A study of the interactions between monomeric tropocollagen and glycosaminoglycans. *Eur. J. Biochem.* **33:** 387-400, 1973.

Ohshima, H., Sato, O., Kawahara, I., Maeda, T. e Takano, Y. – Responses of immunocompetent cells to cavity preparation in rat molars: an immunohistochemical study using OX6-monoclonal antibody. *Connect Tissue Res.* **32:** 303-311, 1995.

Okiji, T., Jontell, M., Belichenko, P., Bergenholtz, G. e Dahesträm, A. – Perivascular dendritic cells of the human dental pulp. *Acta Physiol. Scand.*. **159:** 163-169, 1987.

Okiji, T., Kawashima, N., Kosaka, T., Matsumoto, A., Kobayashi, C. e Suda, H. – An immunohistochemical study of the distribution of immunocompetent cells, especially macrophages and Ia antigen-expressing cells of heterogeneous populations in normal rat molar pulp. *J. Dent. Res.* **71:** 1196-1202, 1992.

Okiji, T., Kasoka, T., Kamaka, A.M.M., Kawashima, N. e Suda, H. – Age-related changes in the immunoreactivity of the monocyte/macrophage system in rat molar pulp. *Archs. Oral Biol.* **41:** 453-460, 1996.

Olgart, L.M. – Involvement of sensory nerves in hemodynamic reactions. *Proc. Finn. Dent. Soc.* **88** Suppl. 1: 403-410, 1992.

Oswald, R.J. e Byers, M.R. – The injury response of pulpal NPY-IR sympathetic fibers differs from that of sensory afferent fibers. *Neurosci. Lett.* **164:** 190-194, 1993.

Panopoulos, P. – Factors influencing the occurrence of pain in carious teeth. *Proc. Finn. Dent. Soc.*, 88, Suppl. I, 155-160, 1992.

Parker, D. A. S., Hennian, E., Marino, V. e de la Lande, I.S. – Inhibitory effects of adrenaline on the release of noradrenaline from sympathetic nerves in human dental pulp. *Archs. Oral Biol.* **44:** 391-394, 1999.

Pashley, D.H. – Mechanisms of dentin sensitivity. *Dent. Clin. North Amer.* **34:** 449-473, 1990.

Paxinos, G. e Watson, C. – The rat brain in stereotaxic coordinates. Academy Press, Sydney, San Diego, 1998.

Payan, D.G. e Goetzl, E.J. – Modulation of lymphocyte function by sensory neuropeptides. *J. Immunol.* **135:** 7835-7865, 1985.

Pernow, B. – Role of tachynins in neurogenic inflammation. *J. Immunol.* **135:** J812S-815S, 1985.

Piskin, B., Aktener, B.O. e Karakisi, H. – Neural changes in ulcerative and hyperplastic pulpitis: a transmission electron microscopic study. *Intern. Endod. J.* **26:** 234-240, 1993.

Pohto, P. e Antila, R. – Demonstration of adrenergic nerve fibers in human dental pulp by histochemical fluorescence method. *Acta Odontol. Scand.* **26:** 137-144, 1968a.

Pohto, P. e Antila, R. – Acetylcholinesterase and noradrenaline in the nerves of mammalian dental pulps. *Acta Odontol. Scand.* **26:** 641-656, 1968b.

Raab, W.H.-M. – Temperature related changes in pulpal microocirculation. *Proc. Finn. Dent. Soc.* **88** Suppl. 1: 469-479, 1992.

Roitt, I., Brostoff, J. e Male, D. – Immunology, Churchill Livingstone, Edimburgo, 1985.

Ruch, J.V. – Odontoblasts: developmental aspects. In: *Dynamic aspects of dental pulp* (eds. Inoki, R., Kudo, T. e Olgart, L.M.), pp. 29-50, Chapman e Hall, Londres, 1990.

Sakai, H. – An immunohistochemical study of HLA-DR and α-anti-chymotrypsin positive cells in the pulp of human non-carious and carious teeth. *Archs. Oral Biol.* **41:** 627-630, 1996.

Sakurai, K., Okiji, T. e Suda, H. – Co-increase of nerve fibers and HLA-DR-and/or factor XIIIa-expressing dendritic cells in dentinal caries-affected regions of the human dental pulp: an immunohistochemical study. *J. Dent. Res.* **78:** 1596-1608, 1999.

Sann, H., Jancsó, G., Ambrus, A. e Pieran, F.-K. – Capsaicin treatment induces selective sensory degeneration and increases sympathetic innervation in the rat ureter. *Neuroscience* **18:** 727-747, 1986.

Scibetta, C.J. e King, R.B. – Hyperpolarizing influence of trigeminal nucleus caudalis on primary afferent preterminals, in trigeminal nucleus oralis. *J. Neurophysiol.* **32:** 229-238, 1969.

Seltzer, S. e Bender, I.B. – The Dental Pulp, 3ª ed., Ishiyaku EuroAmerica, S. Luís, 1990.

Sessle, B.J. e Greewood, L.F. – Inputs to trigeminal brain stem neurones from facial, oral, tooth pulp and pharyngolaryngeal tissues: I. Responses to inocuous and noxious stimuli. *Brain Res.* **117:** 211-226, 1976.

Shafer, W.G., Hine, M.K. e Levy, B.M. – Tratado de Patologia Bucal, 3ª ed. Guanabara, Rio de Janeiro, 1987.

Shanta, T.R. e Bourne, G.H. – The perineural epithelium – a new concept. In *The structure and function of nervous tissue* (ed. Bourne, G.F.), vol. 1, pp. 380-459, Academic Press, Nova Iorque e Londres, 1968.

Shellhammer, S.B., Gowgiel, J.M., Gaik, G.C. e Weine, F.S. – Somatotopic organization and transmedian pathways of the rat trigeminal ganglion. *J. Dent. Res.* **63:** 1289-1292, 1984.

Shigenaga, Y., Sakai, A. e Okada, K. – Effects of tooth pulp stimulation in trigeminal nucleus caudalis and adjacent reticular formation in rat. *Brain Res.* **103:** 400-406, 1976.

Shuttleworth, C.A. – Dental pulp fibroblasts in culture. In: *Dynamic aspects of dental pulp* (eds. Inoki, R., Kudo, T. e Olgart, L.M.), pp 51-68. Chapman e Hall, Londres. 1990a.

Shuttleworth, C.A. – Dental pulp matrix-collagens and glycoproteins, In: *Dynamic aspects of dental pulp* (eds. Inoki, R., Kudo, T. and Olgart, L.M.), pp. 239-258. Chapman e Hall, Londres. 1990b.

Silverman, J. D. e Kruger, L. – An interpretation of dental innervation based upon the pattern of calcitonin gene-related peptide (CGRP)-immunoreactive thin sensory axons. *Somatosens. Res.* **5:** 157-175, 1987.

Sjökvist, O. – Studies on pain conduction in trigeminal nerve. A contribution to the surgical treatment of facial pain. *Acta Psychiat. Neurol. Scand.* Suppl. **17:** 1-139, 1938.

Smith, D.W. e Day, T.A.. – C-*fos* expression in hypothalamic neurosecretory and brain stem cathecolamine cells following noxious somatic stimuli. *Neuroscience* **58:** 765-775, 1994.

Stryer, L. – Biochemistry, 4ª ed. Freeman, Nova Iorque, 1995.

Sugimoto, T., Takemura, M., Wakisaka, S., Akai, M. e Sakai, A. – Cell size spectra of trigeminal primary neurons innervating the mandibular incisor and molar tooth pulps of the rat. *J. Osaka Univ. Dent. School.* **27:** 65-73, 1987.

Sugimoto, T., Takemura, M. e Mukai, N. – Histochemical demonstration of the neural carbonic anhydrase activity within the mandibular molar and incisor tooth pulps of the rat. *Brain Res.* **529:** 245-254, 1990.

Sugiura, Y., Hosoya, Y., Ito, R. e Kohno, K. – Ultrastructural features of functionally

identified primary afferent neurons with C (unmyelinated) fibers of the guinea pig: classification of dorsal root ganglion cell type with reference to sensory modality. *J. Comp. Neurol.* **276:** 265-278, 1988.

Taylor, P.E. e Byers, M.R. – An immunocytochemical study of the morphological reaction of nerves containing calcitonin-gene-related peptide to microabscess formation and healing in rat molars. *Archs. Oral Biol.* **35:** 629-638, 1990.

Taylor, P.E., Byers, M.R. e Redd, P.E. – Sprouting of CGRP nerve fibers in response to dentine injury in rat molars. *Brain Res.* **461:** 371-376, 1988.

Tiwari, R. e King, R.B. – Fiber projections from trigeminal nucleus caudalis in primates (squirrel monkey and baboon). *J. Comp. Neurol.* **158:** 191-206, 1974

Trowbridge, H.O. – Pathogenesis of pulpitis resulting from dental caries. *J. Endod.* **7:** 52-60, 1981.

Uddman, R. Grunditz, T. e Sundler, F. – Neuropeptide Y: occurrence and distribution in dental pulps. *Acta Odontol. Scand.* **42:** 361-365, 1984.

Van Amerongen, J.P., Lemmens, A.G. e Tonino, G. J. M. – Glycosaminoglycans in dental pulp. In: *Dynamic aspect of dental pulp* (eds. Inoki, R., Kudo, T. e Olgart, L.M.), pp. 259-276. Chapman e Hall, Londres. 1990.

Vongsavan, N. e Mattthews, B. – Changes in pulpal blood flow and in fluid flow through dentine produced by autonomic and sensory nerve stimulation in the cat. *Proc. Finn. Dent. Soc.* **88** Suppl. I: 491-497, 1992.

Vyklicky, L., Keller, O., Jastreboff, P., Vyklicky Jr., L. e Butkhuzi, S.M. – Spinal trigeminal tractotomy and nociceptive reactions evoked by tooth pulp stimulation in the cat. *J. Physiol., Paris,* **73:** 379-386, 1977.

Wakabayashi, Y., Tomoyoshi, T., Fujimiya, M., Arai, R.. e Maeda, T. – Substance P-containing axon terminals in the mucosa of the human urinary bladder: pre-embedding immunohistochemistry using cryostat sections for electron microscopy. *Histochemistry* **100:** 401-407, 1993.

Wakisaka, S. e Akai, M. – Immunohistochemical observation on neuropeptides around the blood vessels in feline dental pulp. *J. Endod.* **15:** 413-416, 1989.

Wakisaka, S., Ichikawa, H., Nishimoto, T., Matsuo, S., Yamamoto, K., Nakata, T. e Akai, M. – Substance P-like immunoreactivity in the pulp-dentine zone of human molar teeth demonstrated by indirect immunofluorescence. *Archs. Oral Biol.* **29:** 73-75, 1984.

Westrum, L.E., Canfield, R.C. e Black, R.G. – Transganglionic degeneration in the spinal trigeminal nucleus following removal of tooth pulps in adult cats. *Brain Res.* **101:** 137-140, 1976.

Westrum, L.E., Canfield, R.C. e O'Connor, T. – Each canine tooth projects to all brain stem trigeminal nuclei in cat. *Exp. Neurol.* **74:** 787-799, 1981.

Yamamura, T. – Differentiation of pulpal cells and inductive influence of various matrices with reference to pulpal wound healing. *J. Dent. Res.* **64:** 530-540, 1985.

Young, R.F. – Effect of trigeminal tractotomy on dental sensation in humans. *J. Neurosurg.* **56:** 812-818, 1982.

Young., R.F., Oleson, T.D. e Perryman, K.M. – Effect of trigeminal tractotomy on behavioral response to dental pulp stimulation in the monkey. *J. Neurosurg.* **55:** 420-430, 1981.

ILUSTRAÇÕES

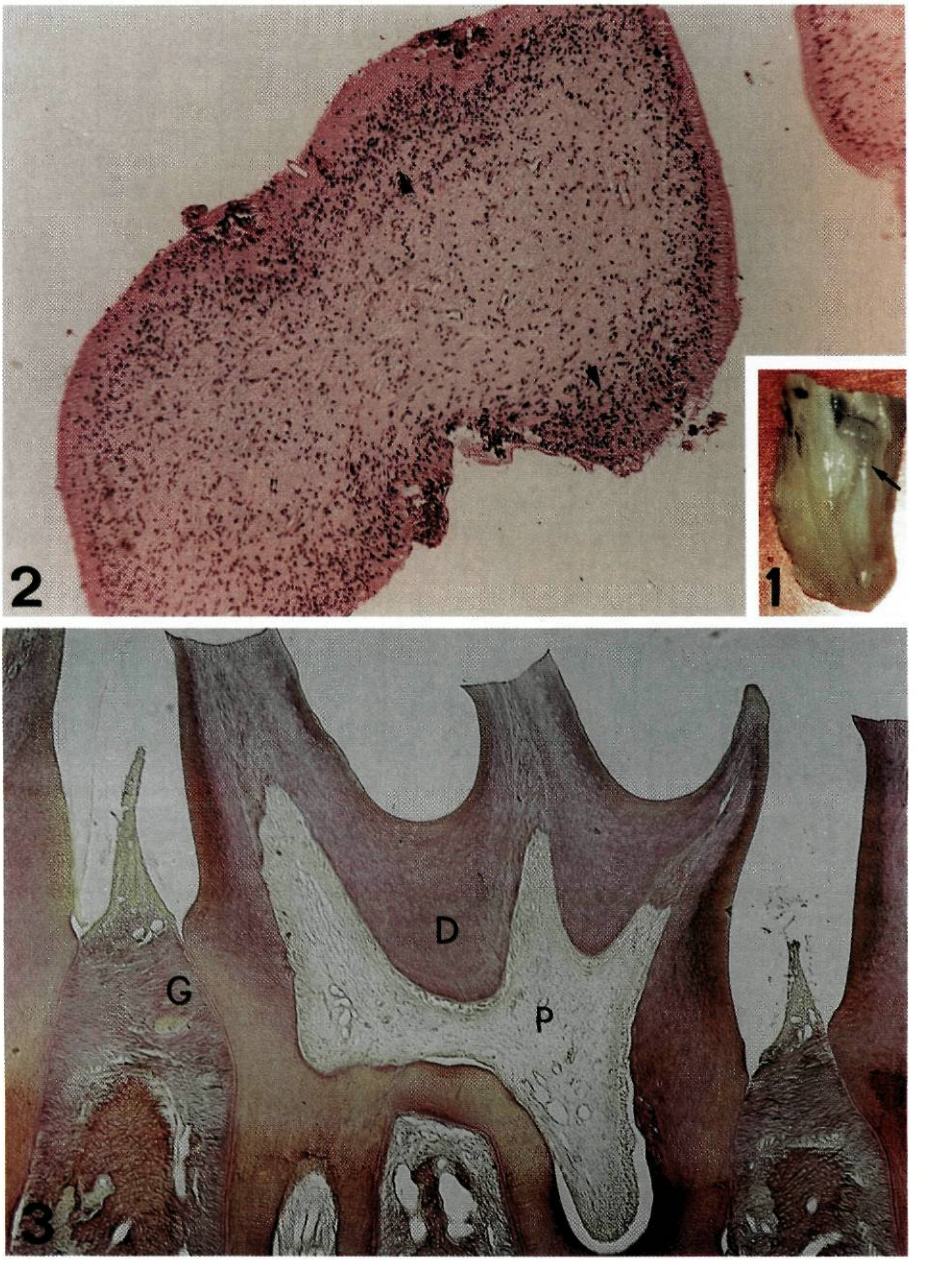
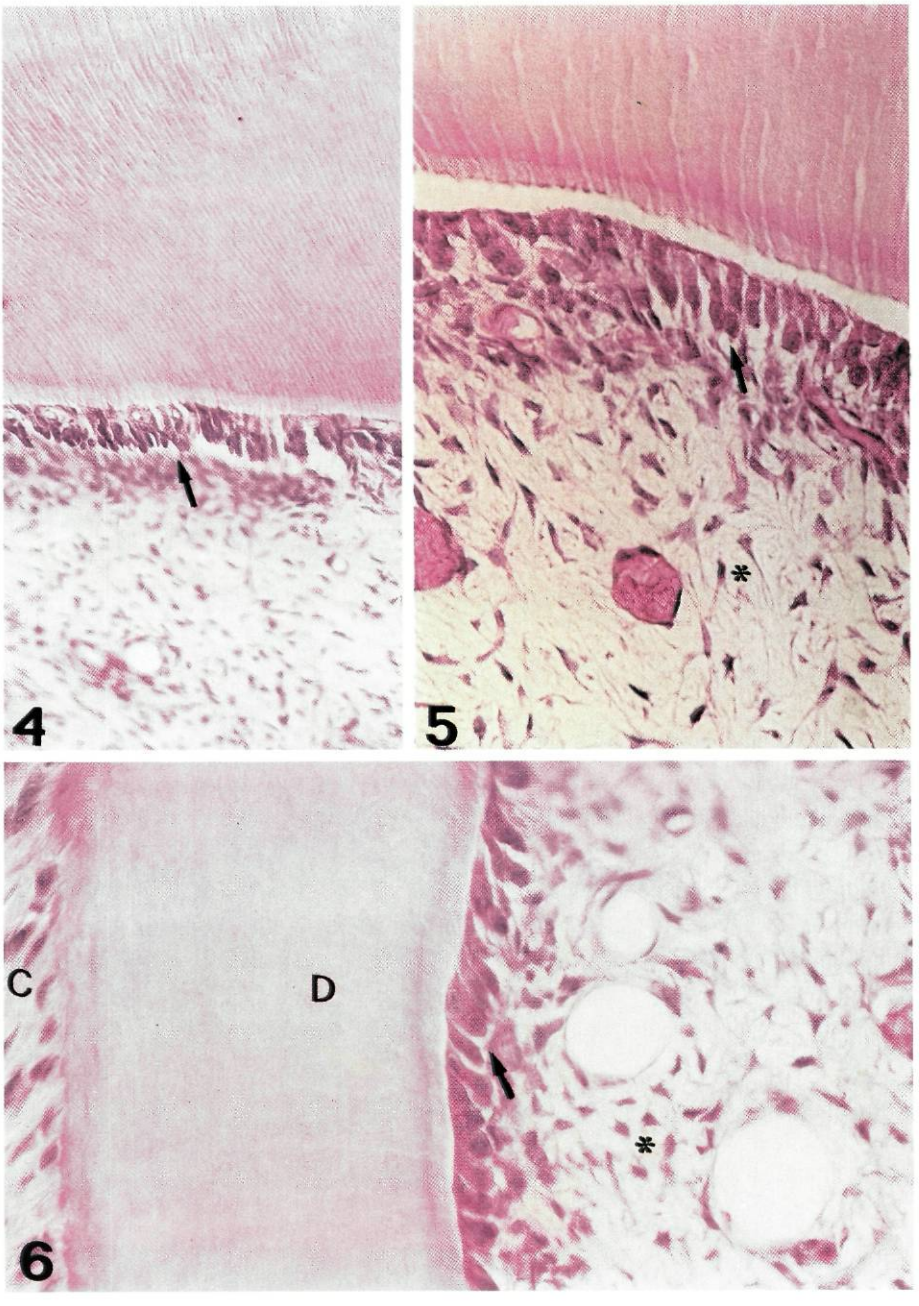
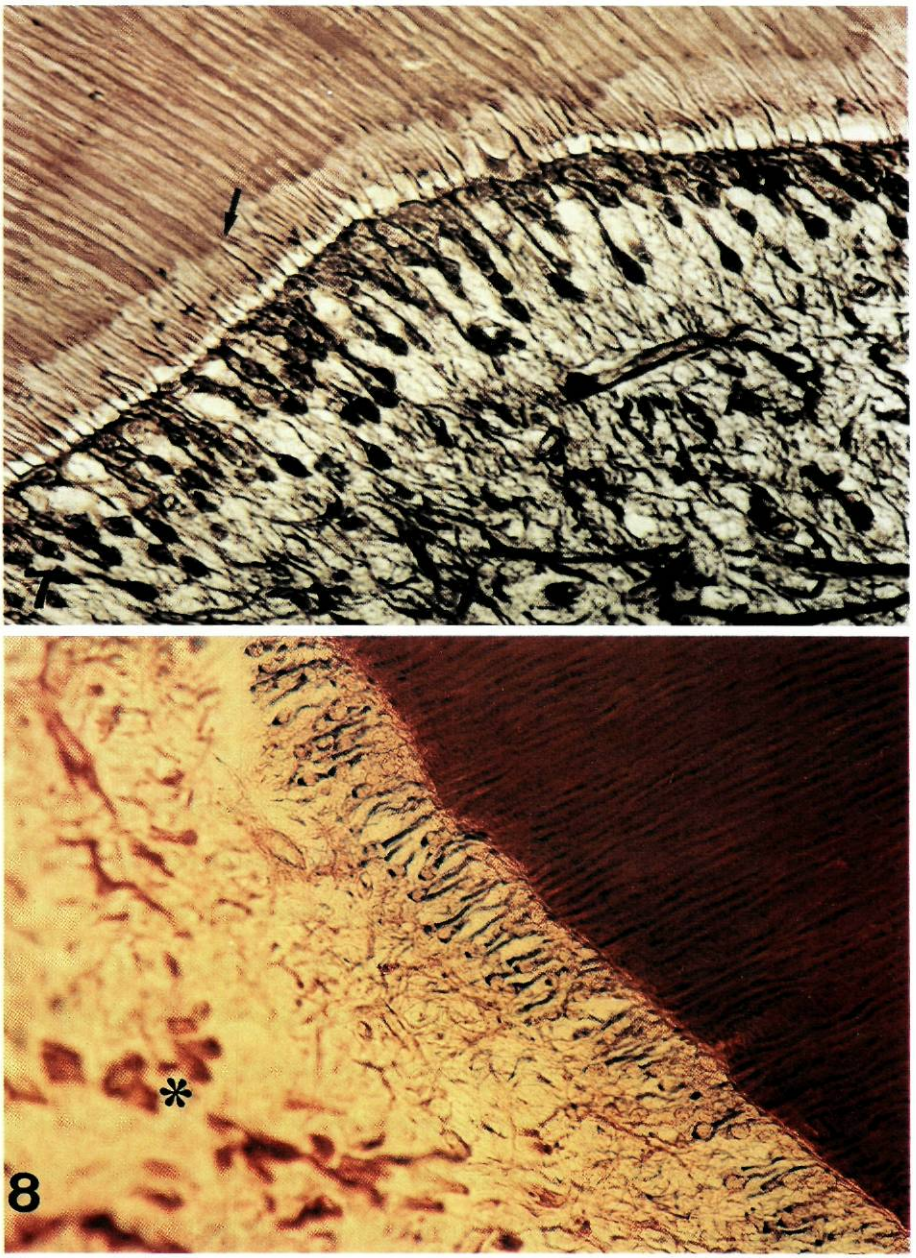


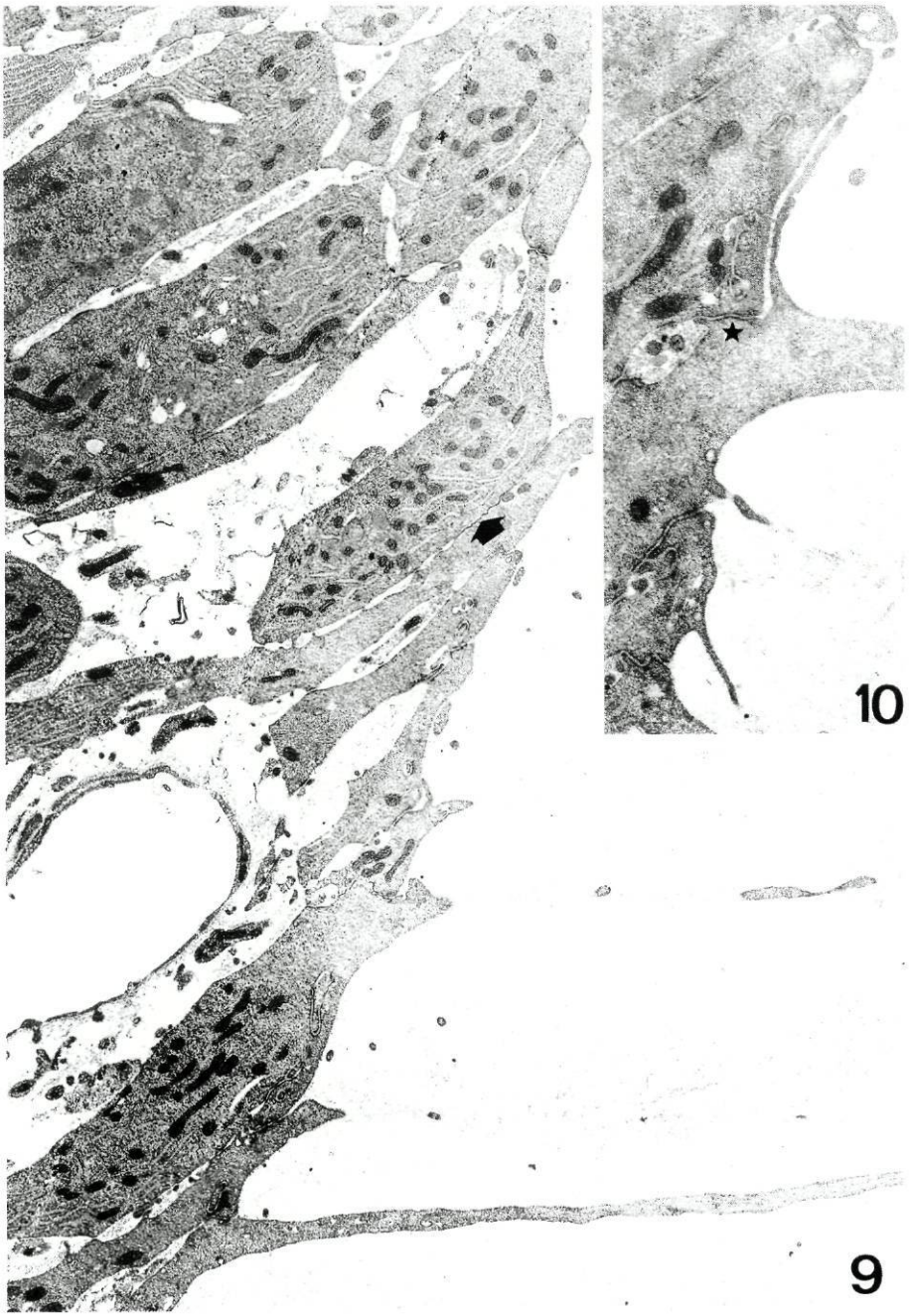
Fig. 1 – Molar humano seccionado verticalmente com a polpa íntegra (seta). x 1,6. *Fig. 2* – Corte histológico horizontal da polpa obtida como em *1* de um dente portador de cárie com discreto infiltrado inflamatório (cabeças de setas). Os prolongamentos odontoblásticos estão ausentes. HE. x 72. *Fig. 3* – Corte vertical de molar descalcificado normal de rato. HE. D – dentina, G - gengiva aderida, P – polpa. HE. x 46.



Figs. 4-6 – Cortes verticais de dentes descalcificados. Polpa coronal com palissada odontoblástica alta (setas) no rato (*Fig. 4*, x 230) e homem (*Fig. 5*, x 453), esta com numerosos pulpócitos (*). Na polpa apical no homem (*Fig. 6*, x 453), a palissada é achatada (seta). C – cimento. D – dentina. (*) - pulpócitos. HE.



Figs. 7-8 – Dentes humanos descalcificados. *Fig. 7* – Prolongamentos odontoblásticos penetrando os canalículos dentinários (seta). Jabonero. x 464. *Fig. 8* – Citoplasma e prolongamentos odontoblásticos azuis, estes penetrando a dentina. Vasos na polpa (*). Mallory. x 368.



Figs. 9 (x 6.658) e *10* (x 13.375) – Dente de rato descalcificado. Complexos de união do tipo nexo (estrela) e junção apertada (seta) em odontoblastos. ME.

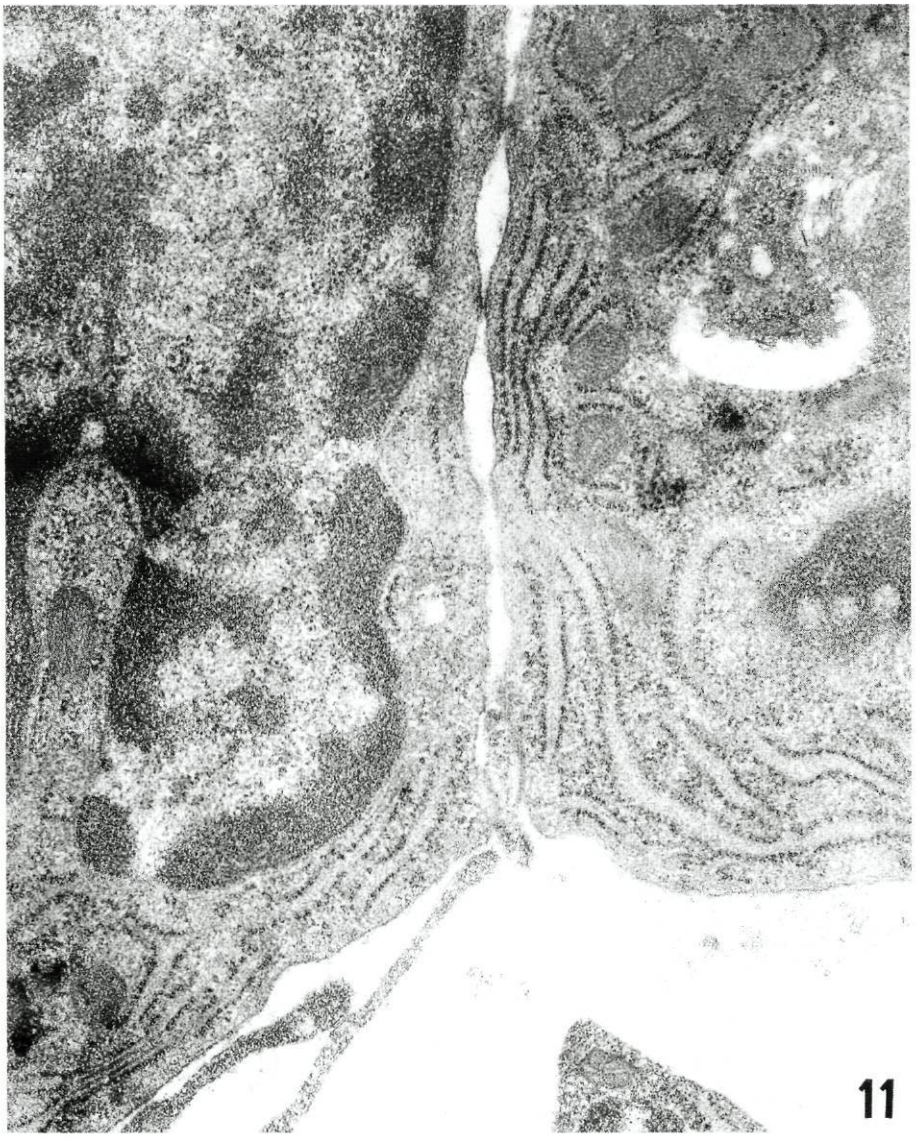


Fig. 11 – Dente humano não descalcificado. Bases de dois odontoblastos ricas em retículo endoplásmico rugoso. ME. x 32.276.

Fig. 12 – Dente humano não descalcificado. Numerosos microtúbulos num prolongamento odontoblástico (*). Junção apertada (seta). ME. x 32.727.

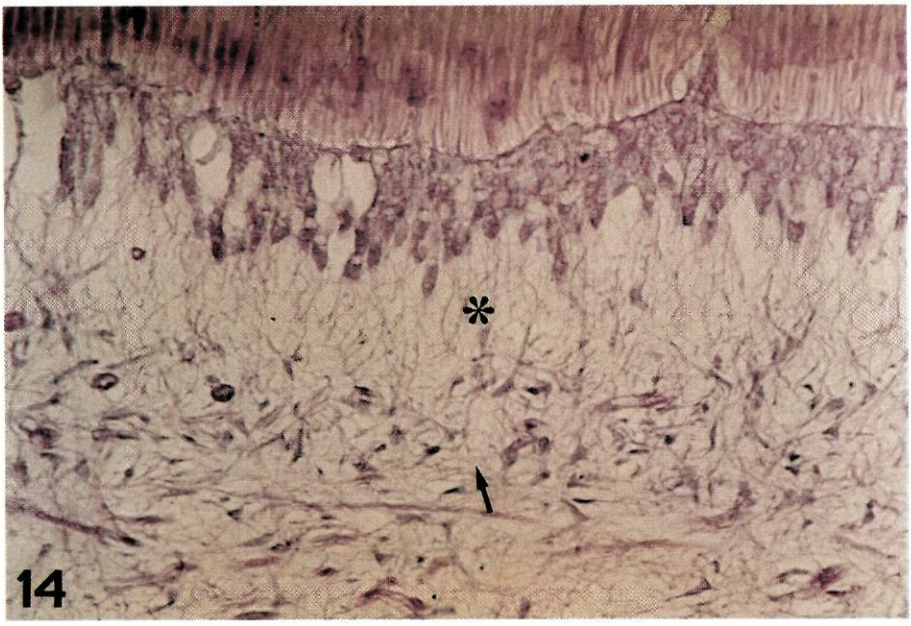


Fig. 13 – Dente humano descalcificado. Zona acelular de Weil muito evidente (*) entre os odontoblastos (acima) e a camada celular. Alguns nervos no centro da polpa. CGRP e hemateína. x 230. *Fig. 14* – Mesmo material. Zona celular da polpa (seta) por baixo da zona acelular (*). PAS e hemateína. x 453.

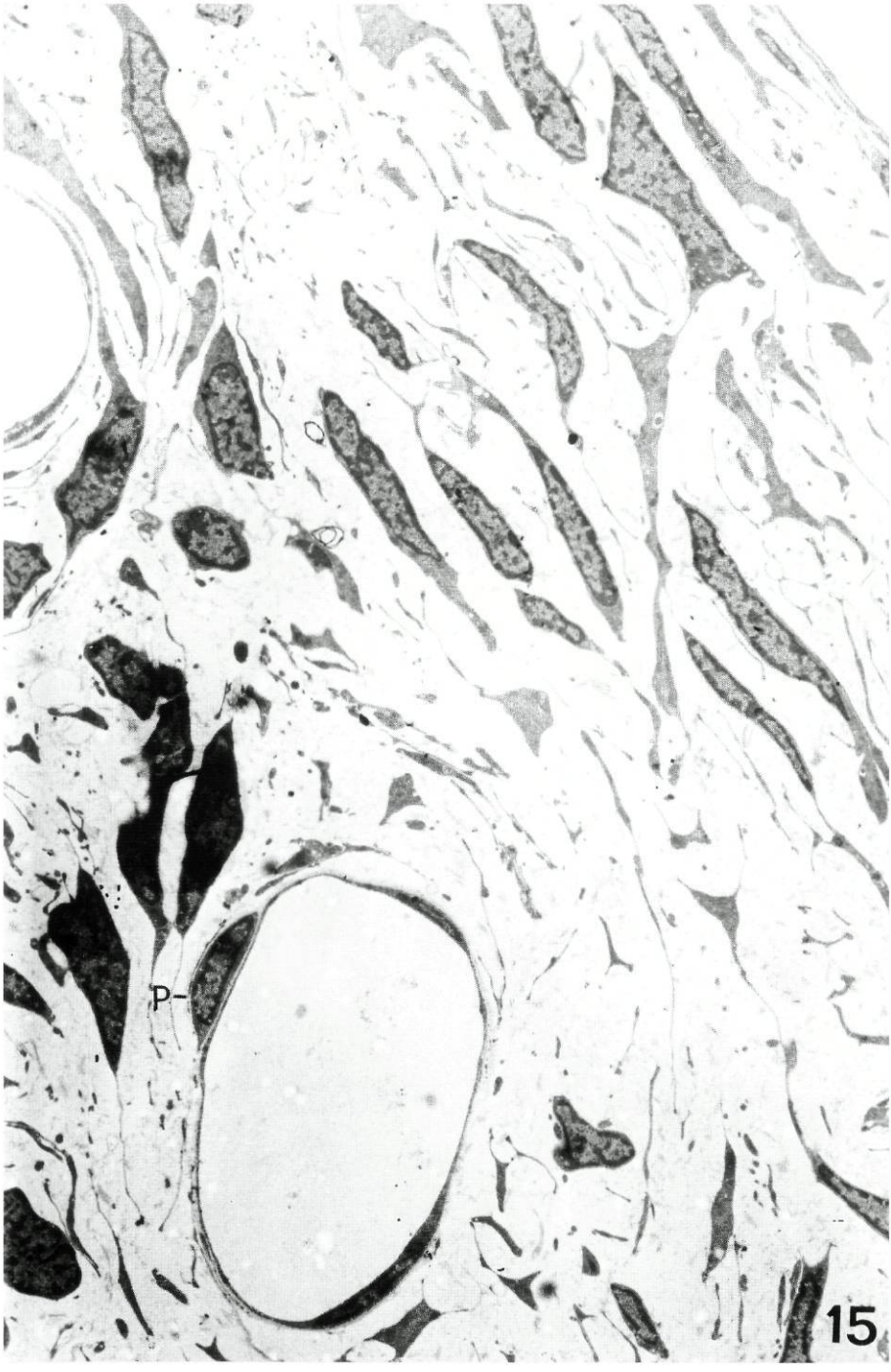


Fig. 15 – Dente descalcificado de rato. Numerosos pulpócitos, a maioria deles de tipo fibrocítico com escassos organelos. Dois capilares contínuos. Pericito (P). ME. x 3.476.

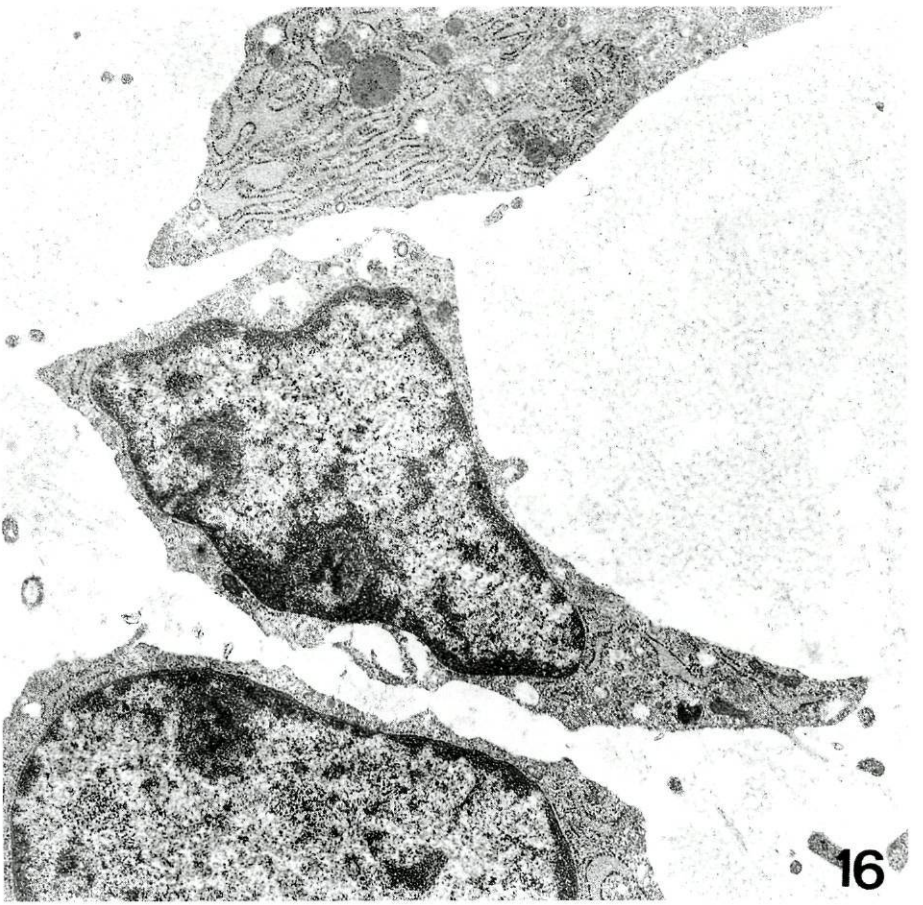


Fig. 16 – Dente humano sem descalcificação. Pulpoblastos ricos em retículo endoplásmico rugoso. ME. x 12.960.

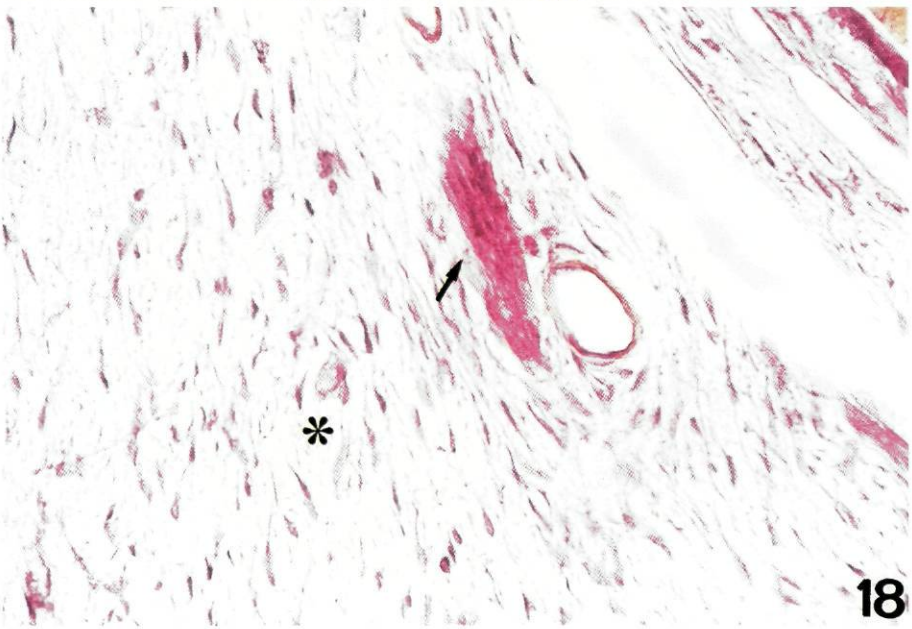
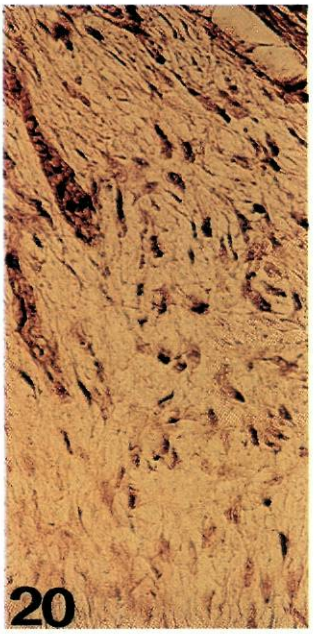


Fig. 17 – Dente de rato descalcificado. Células OX6-IR dendríticas (seta) e do tipo macrofágico (*) num corno pulpar. x 366. *Fig. 18* – Dente humano descalcificado. Matriz intercelular amorfa incolor (*), feixe vásculo-nervoso vermelho (seta). HE. x 453.



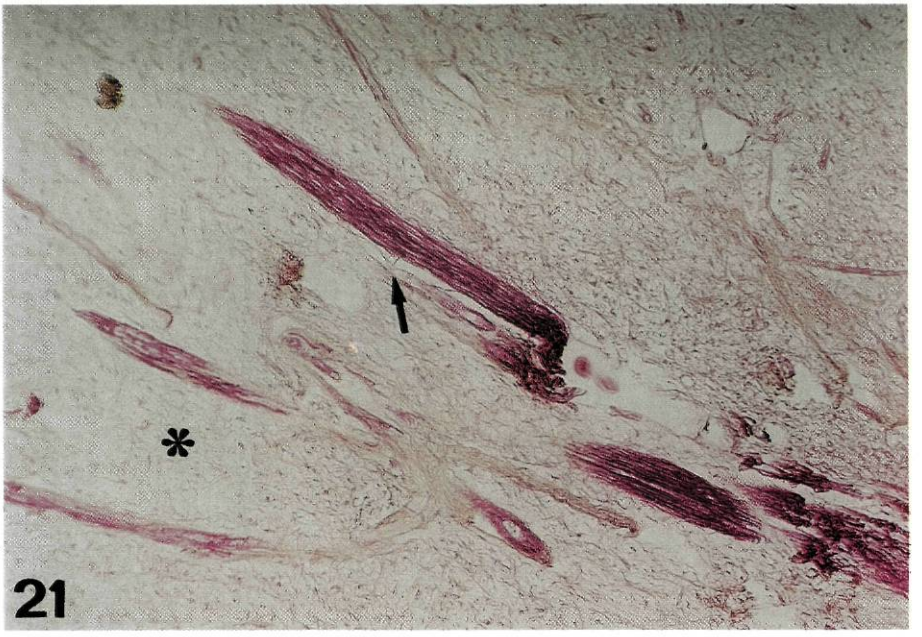
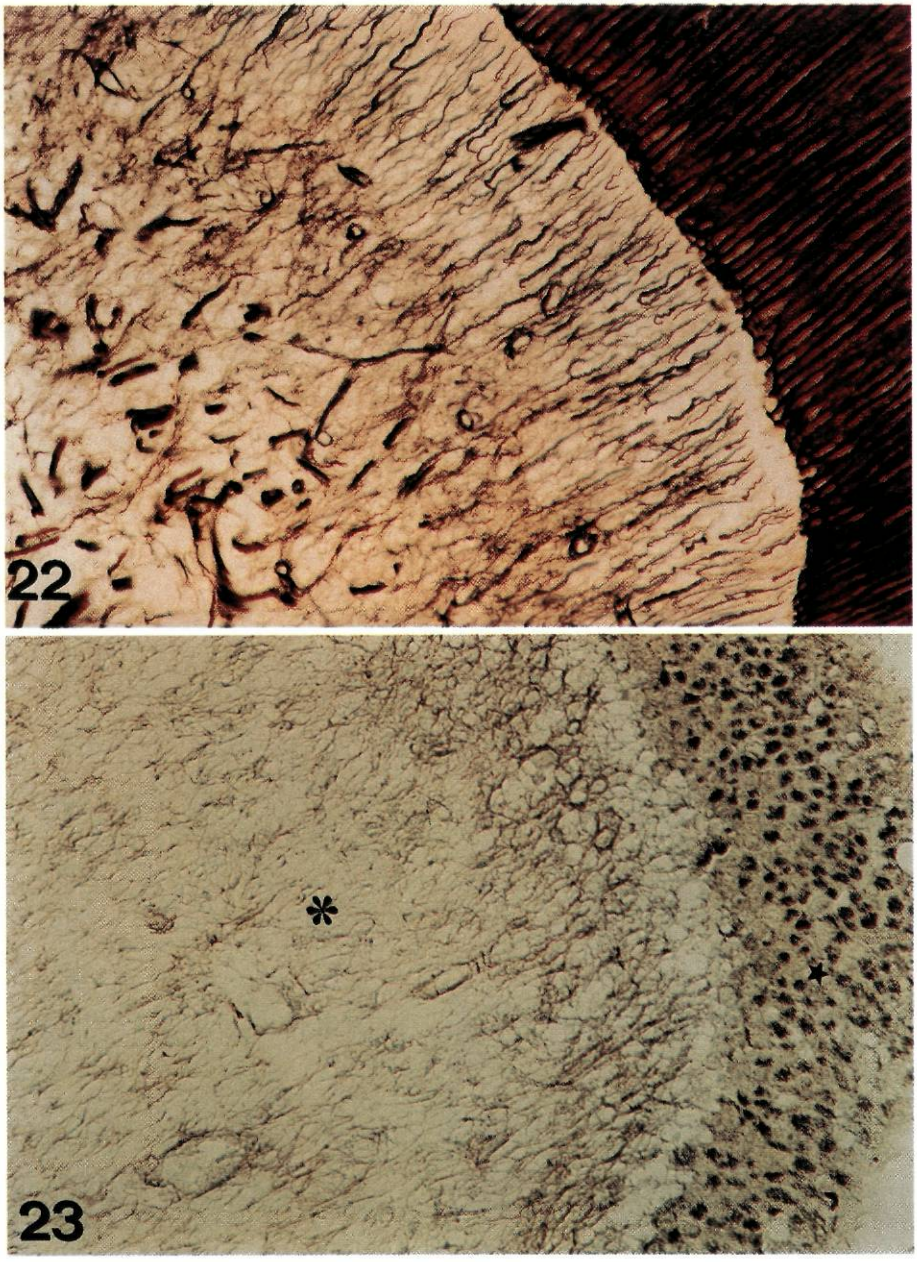


Fig. 19 – Dente humano descalcificado. D - Dentina, C - Cimento. L -Ligamento periodontal.. Mallory. X 232. *Fig. 20* – Mesmo material. Centro da polpa coronal sem fibras de colagénio. Mallory. x 368. *Fig. 21* – Mesmo material. Centro do corno pulpar. Matriz pulpar descorada (*), feixes vásculo-nervosos vermelhos (seta). Van Gieson sem hemateína. x 116.



Figs. 22-23 – Dente humano descalcificado. Em 22, malha argirófila densa na zona acelular e na camada odontoblástica. x 368. Em 23, rede argirófila menos densa no resto da polpa (*). Núcleos de odontoblastos (estrela). Método de Sweet. x 368.

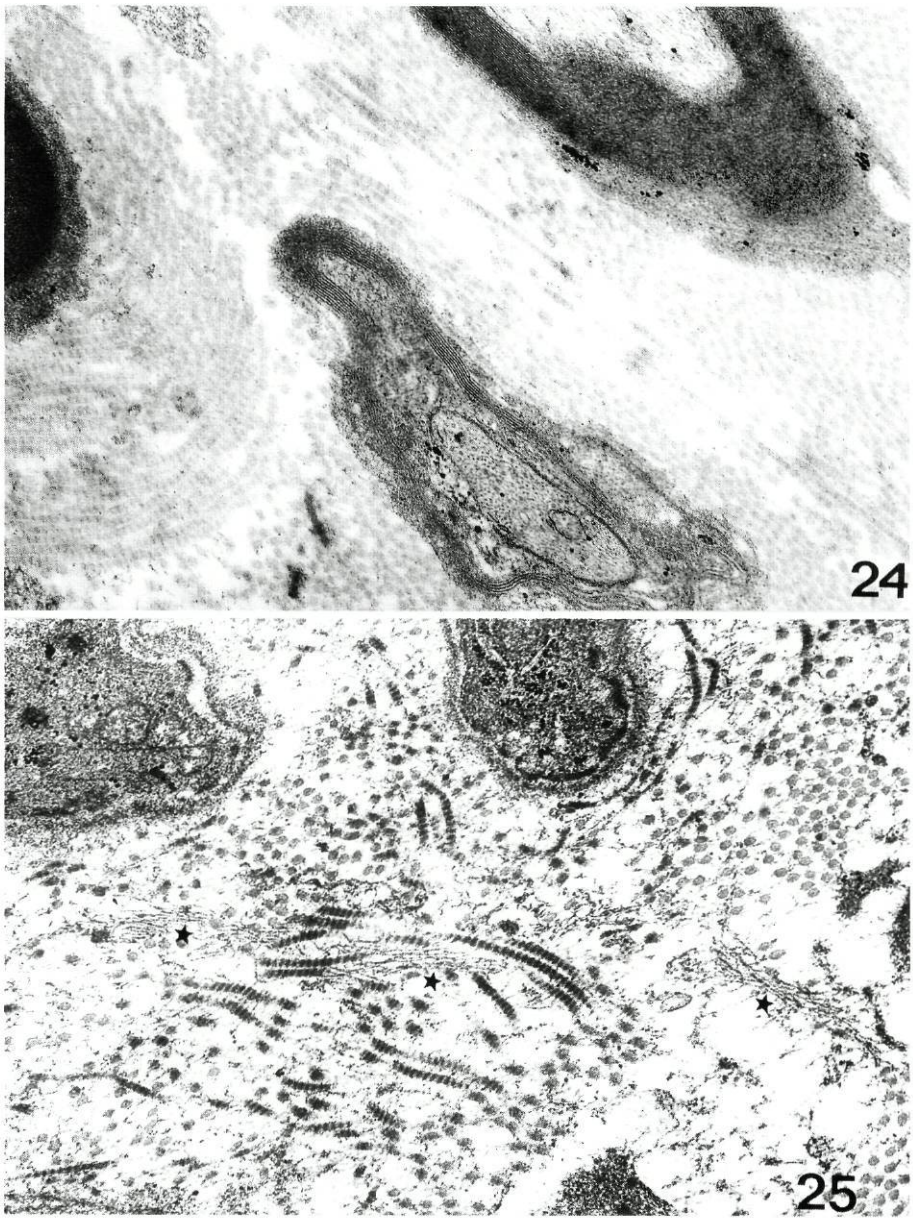


Fig. 24 – Dente humano sem descalcificação. ME. Numerosas fibrilas colagéneas em redor de três fibras mielínicas. Fixação com ácido tânico. x 21.019 *Fig. 25* – Mesmo material. O ácido tânico conferiu grande contraste às fibrilas colagéneas com periodicidade bem patente. Fibras oxitalânicas (estrelas). x 21.019.

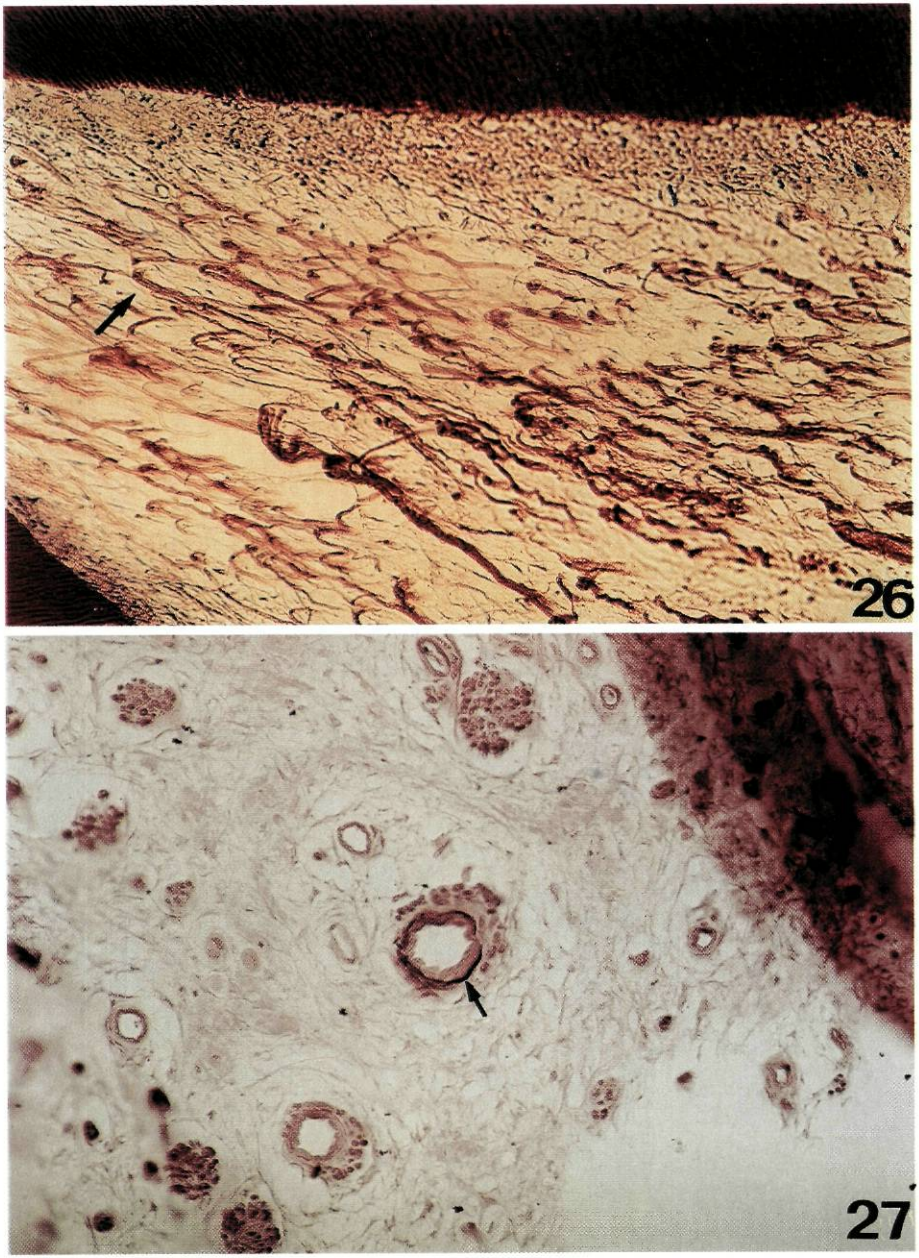


Fig. 26 – Dente humano descalcificado. Corno pulpar. Corte vertical espesso com numerosas ansas vasculares (seta). Mallory. x 184. *Fig. 27* – Mesmo material. Corte transversal fino. Feixe vásculo-nervoso com arteríola com limitante elástica externa (seta). Orceína ácida. x 232.

Fig. 28 – Dente de rato descalcificado. Polpa coronal. Capilar contínuo com pericito. ME. x 6.703.

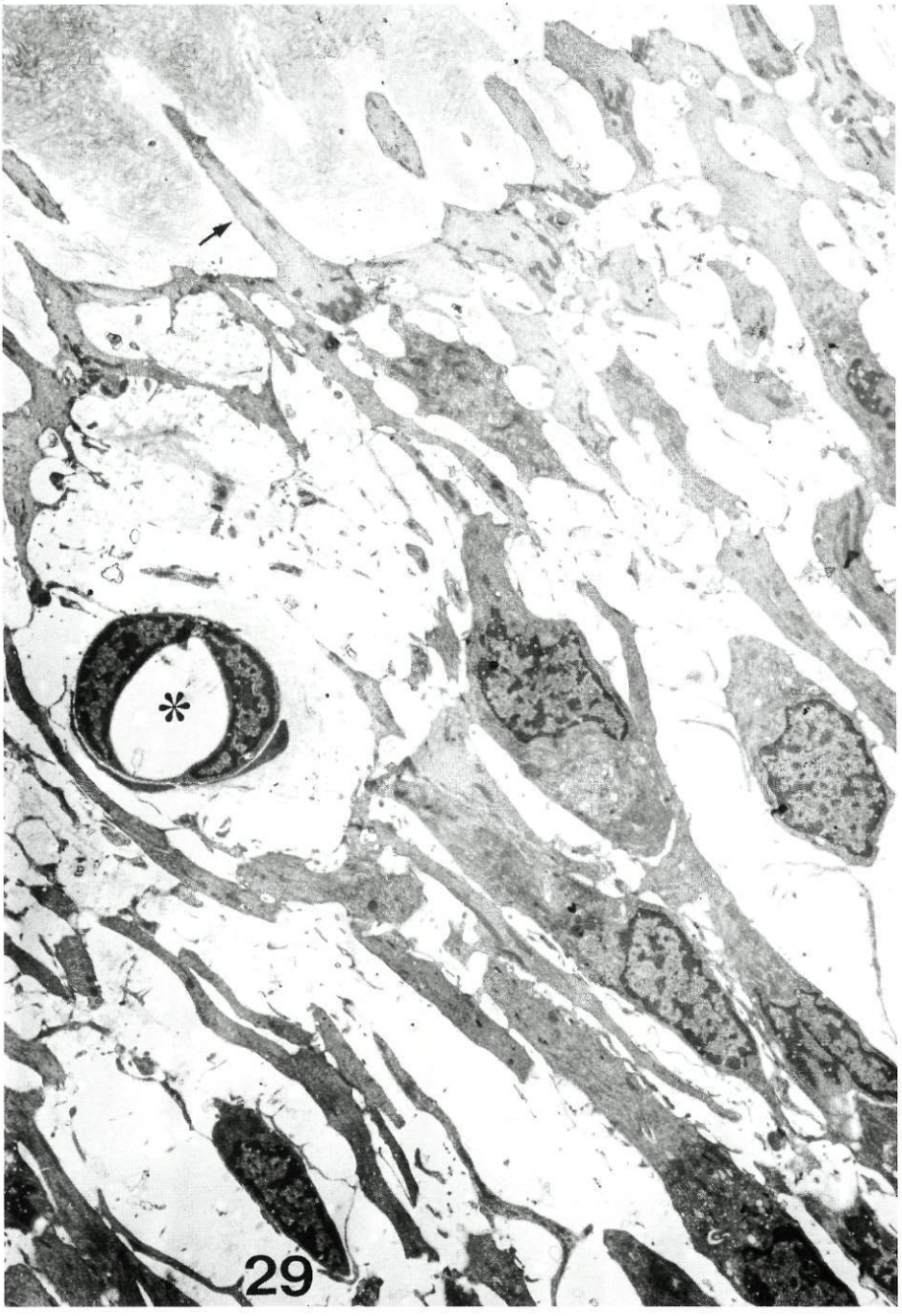
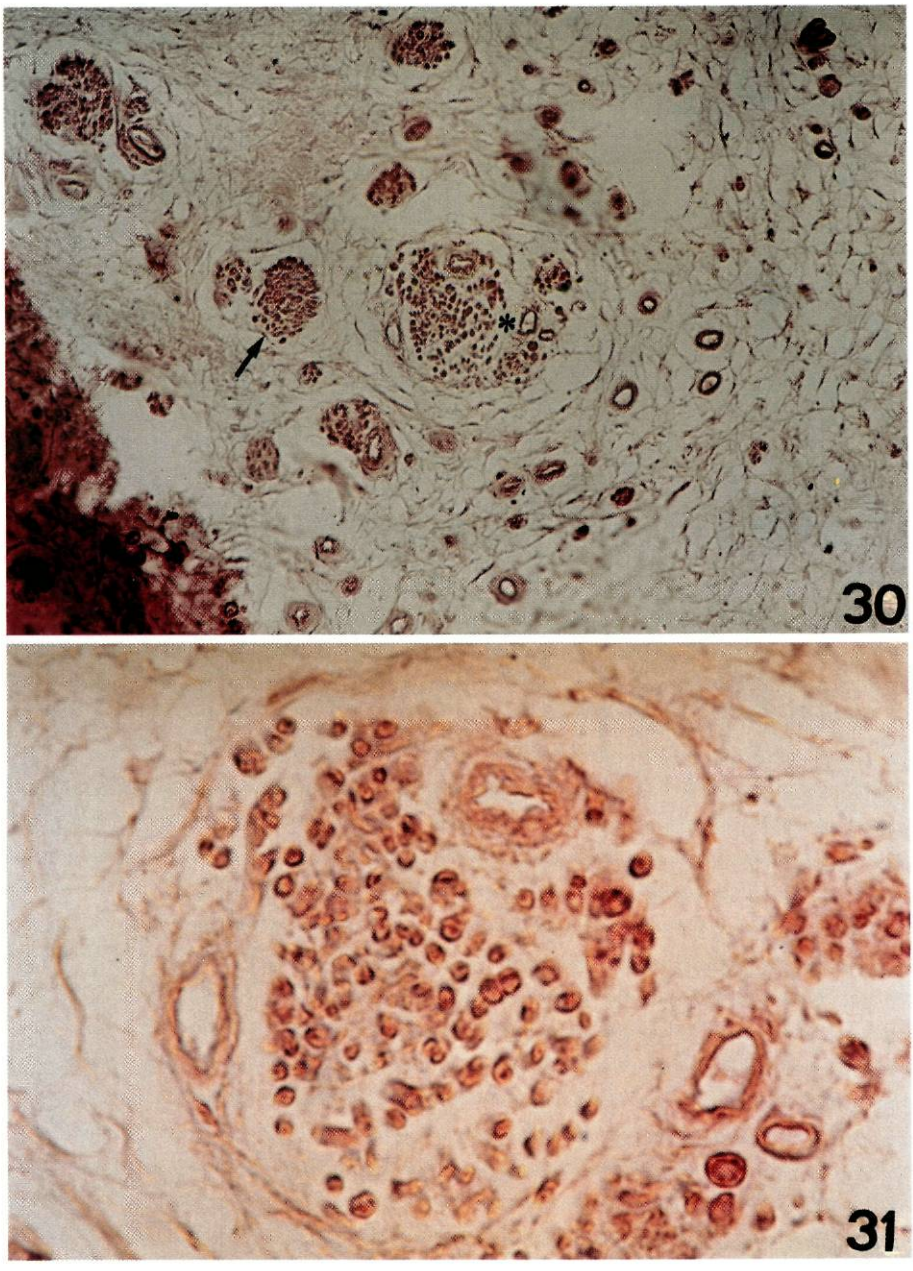


Fig. 29 – Dente de rato descalcificado. Capilar (*) próximo da pré-dentina. Prolongamento odontoblástico (seta). ME. x 3.476.



Figs. 30 e 31 – Dentes humanos descalcificados. Orceína ácida. Em *30*, feixe vásculo-nervoso (*) e fascículo nervoso isolado (seta). x 230. Em *31*, pormenor do feixe vásculo-nervoso. x 906.

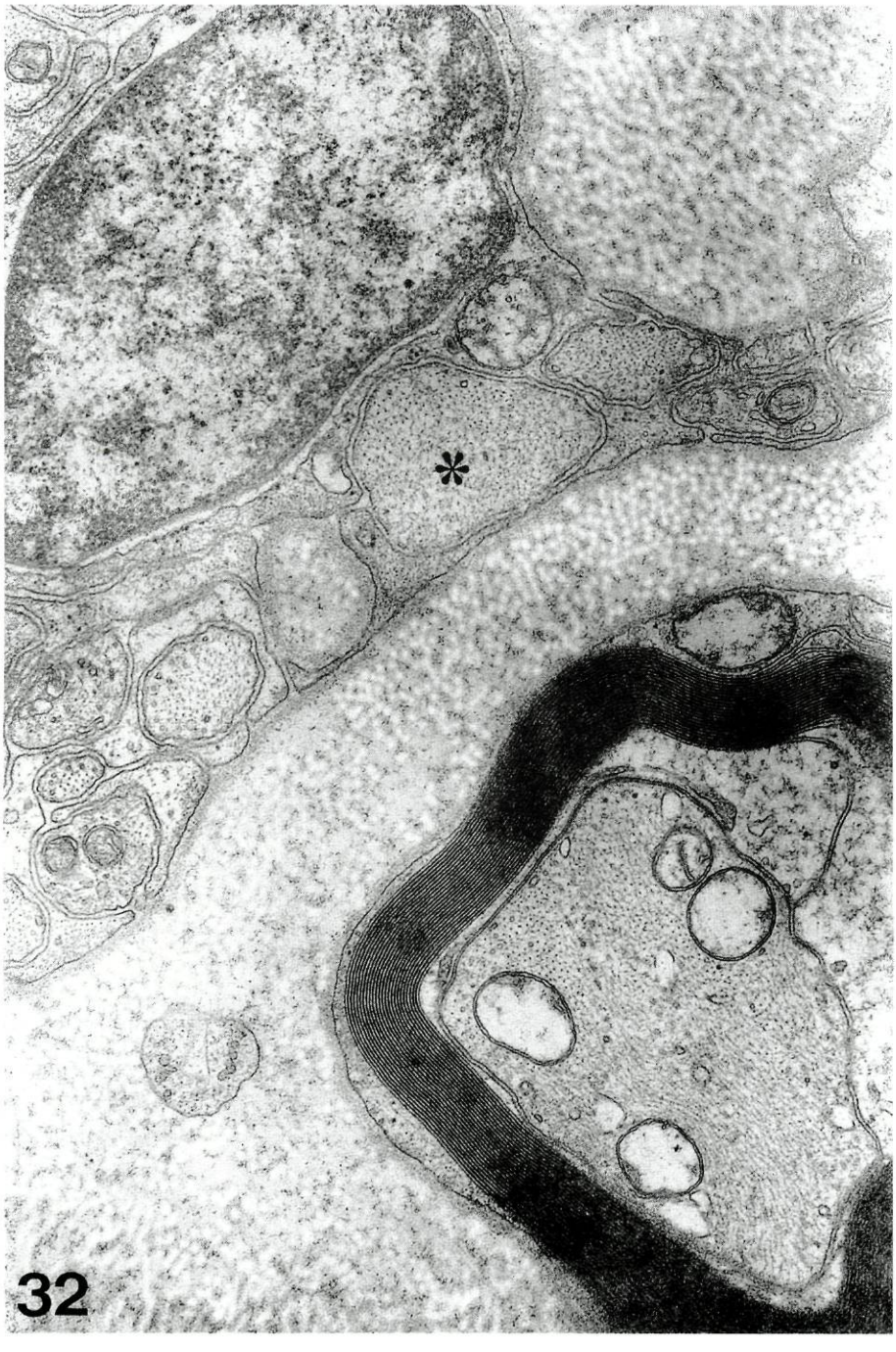


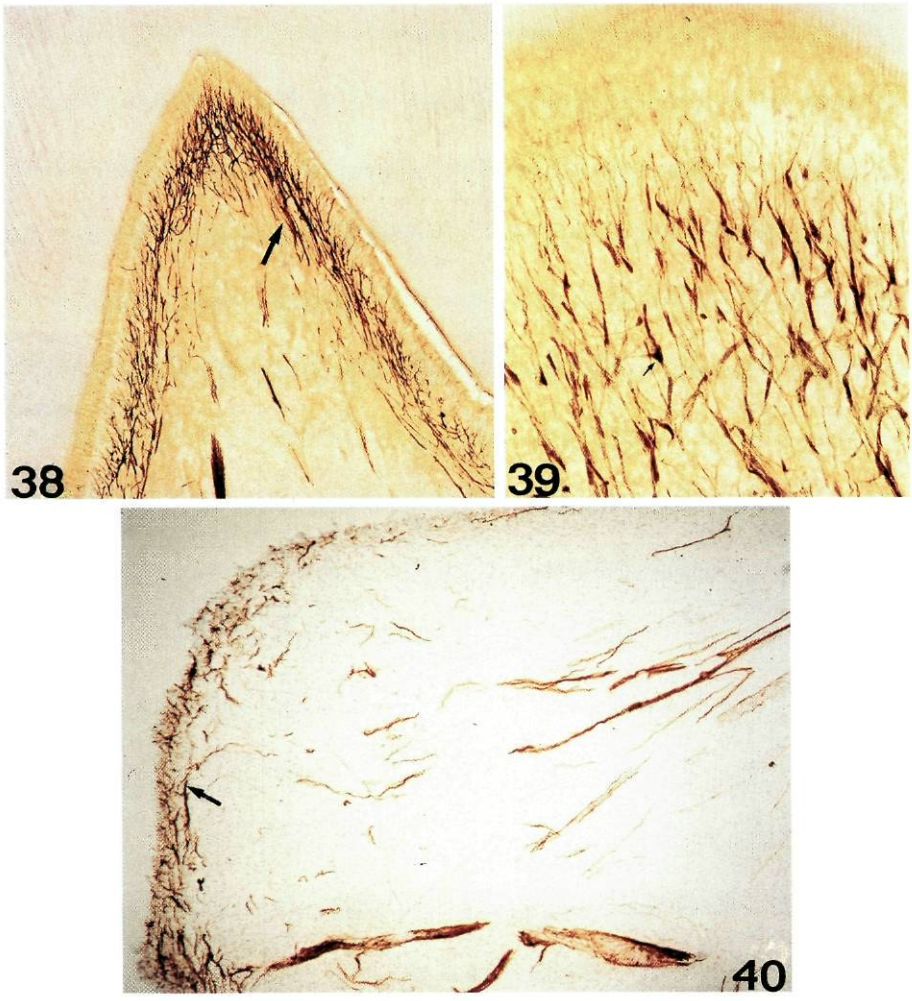
Fig. 32 – Dente humano não descalcificado. Fibra nervosa mielínica em baixo à direita e fibras amielínicas (*) em cima. No interstício fibrilas colagéneas cortadas transversal e obliquamente, mal contrastadas devido à ausência de ácido tânico no fixador. ME. x 25.254.

Fig. 33 – Corno pulpar humano. Várias fibras mielínicas de pequeno calibre. Uma fibra amielínica (*). ME. x 11.571.

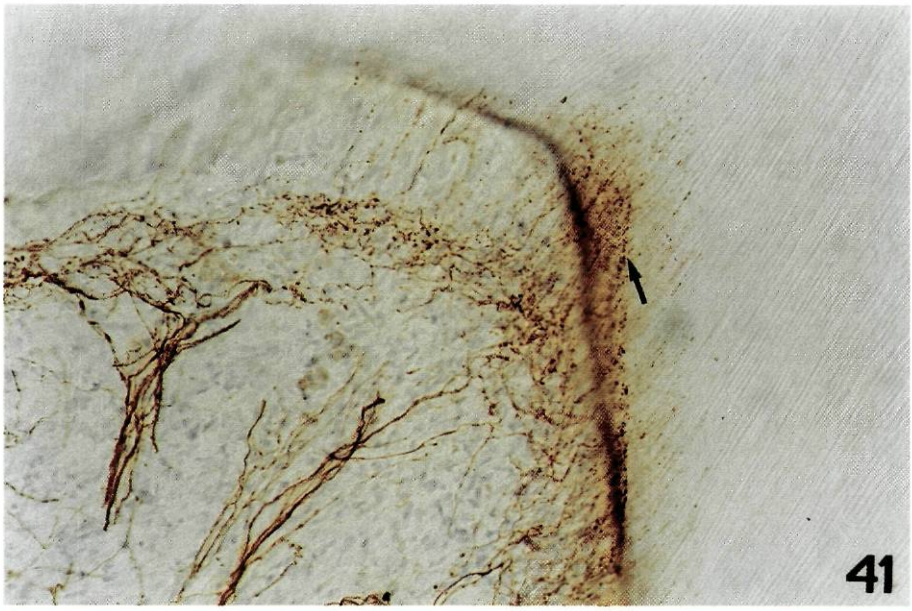
Fig. 34 – Dente de rato descalcificado. Fascículo nervoso limitado por perineuro (seta) que o separa de duas arteríolas no feixe vásculo-nervoso. ME. x 13.500.

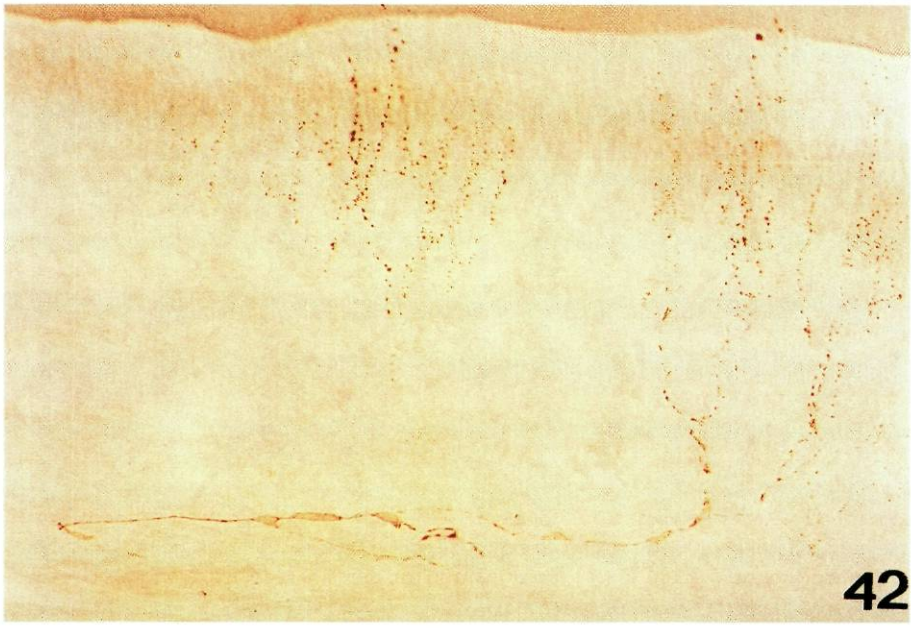
Fig. 35 – Dente de rato descalcificado. Duas fibras mielínicas finas na zona subodontoblástica da polpa. x 8.500.

Figs. 36-37 – Dentes descalcificados de rato. Redes nervosas S-100-IR castanhas. Plexo de Raschkow (cabeça de seta). x 46.



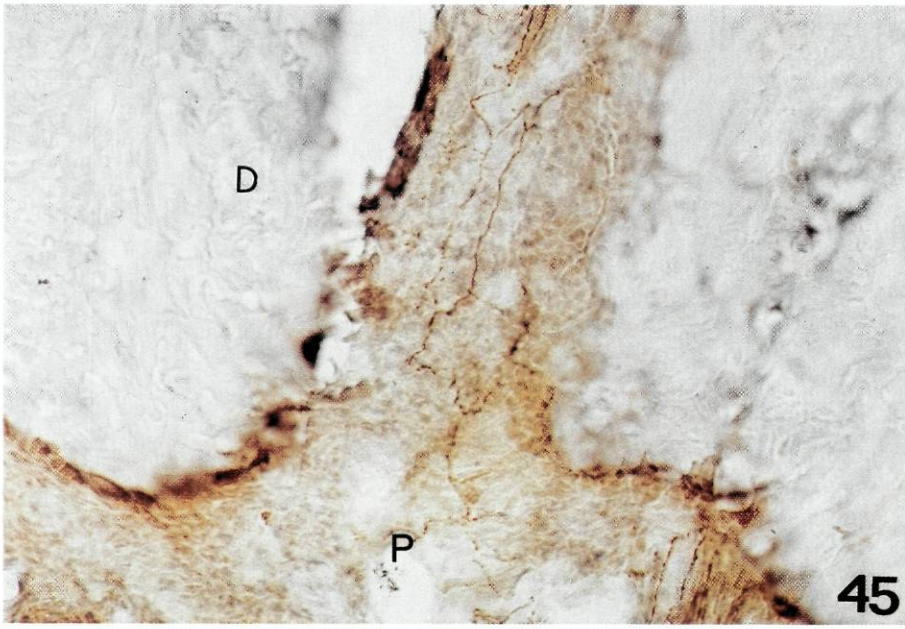
Figs. 38-40 – Redes nervosas S-100-IR. Em *38* e *39*, molares humanos descalcificados. Em 38, plexo de Raschkow muito marcado (seta). x 37. Em *39*, células de Schwann intercaladas no plexo nervoso (seta). x 186. Em *40*, molar humano não descalcificado. Extremidade oclusal para a esquerda. Plexo de Raschkow (seta). x 37.

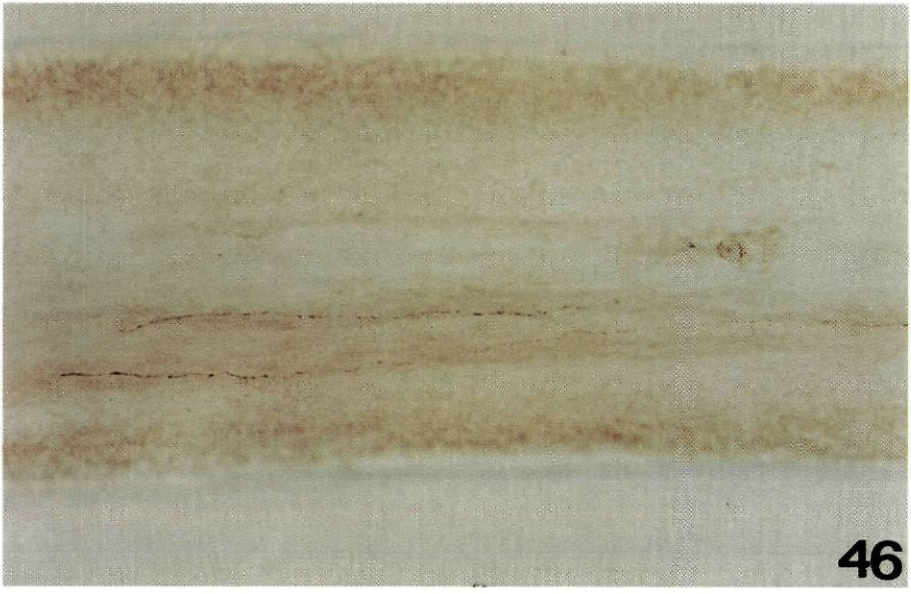




Figs. 41-42 – Dentes descalcificados. Redes nervosas CGRP-IR. x 230. Em *41* (rato), penetração dentinária (seta). Em *42* (homem), aspecto das fibras em rosário de varicosidades.

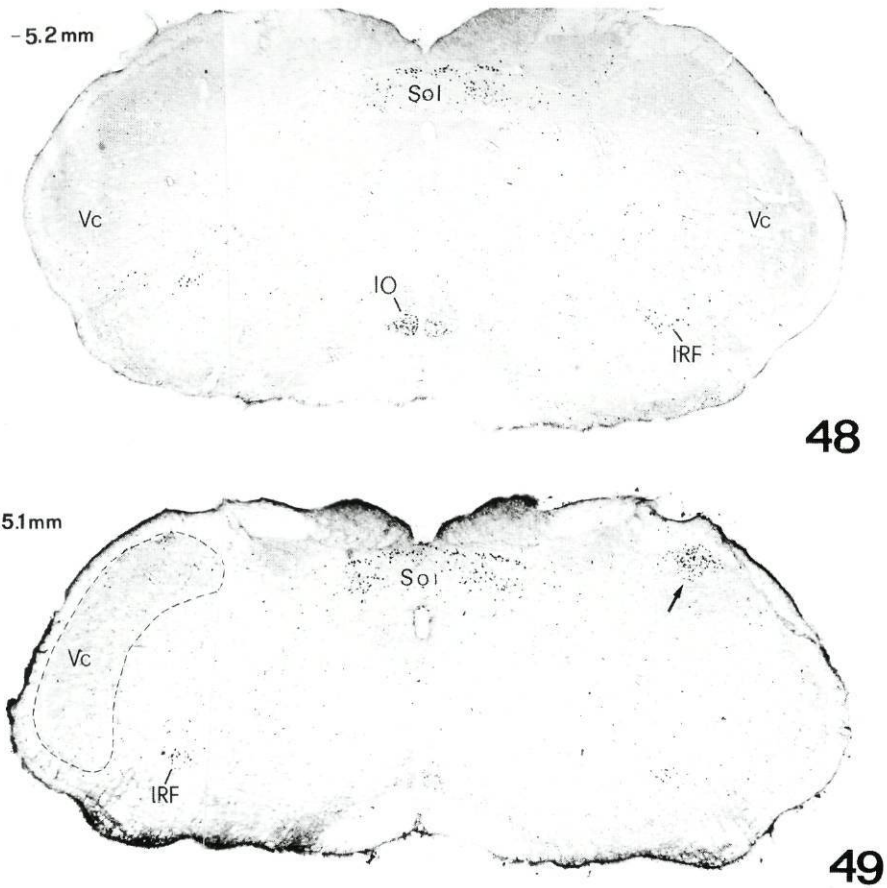
Figs. 43-44 – Dentes descalcificados de rato. Fibras SP-IR. Plexo pulpar muito fino em *43*. x 183. Penetração dentinária em *44* (*). x 366.



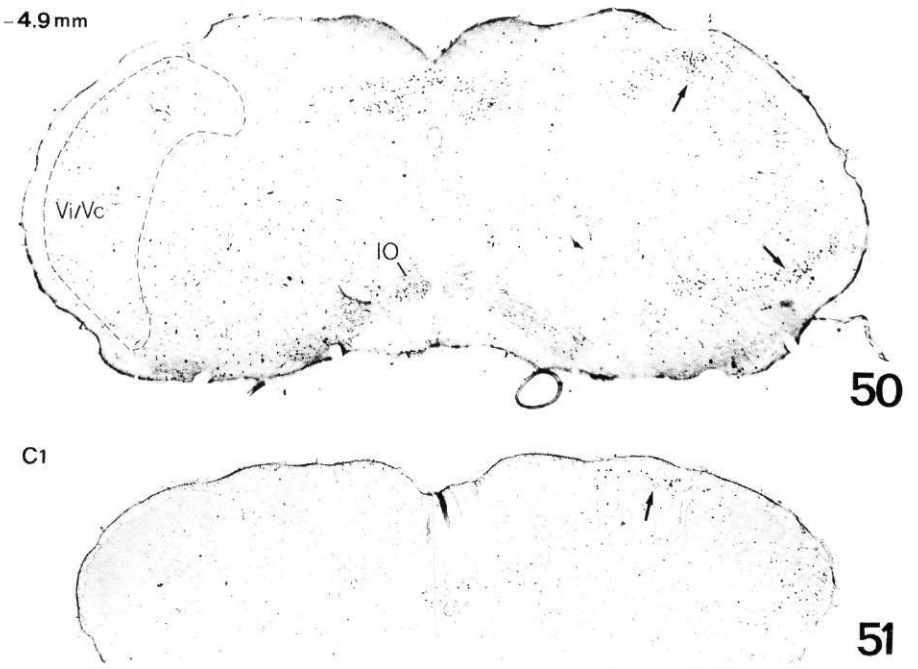


Figs. 45-46 – Fibras autonómas de rato. x 230. Em *45*, plexo NPY-IR no canal apical junto da papila (P). D-dentina. Em *46*, fibras VIP-IR perivasculares na polpa radicular.

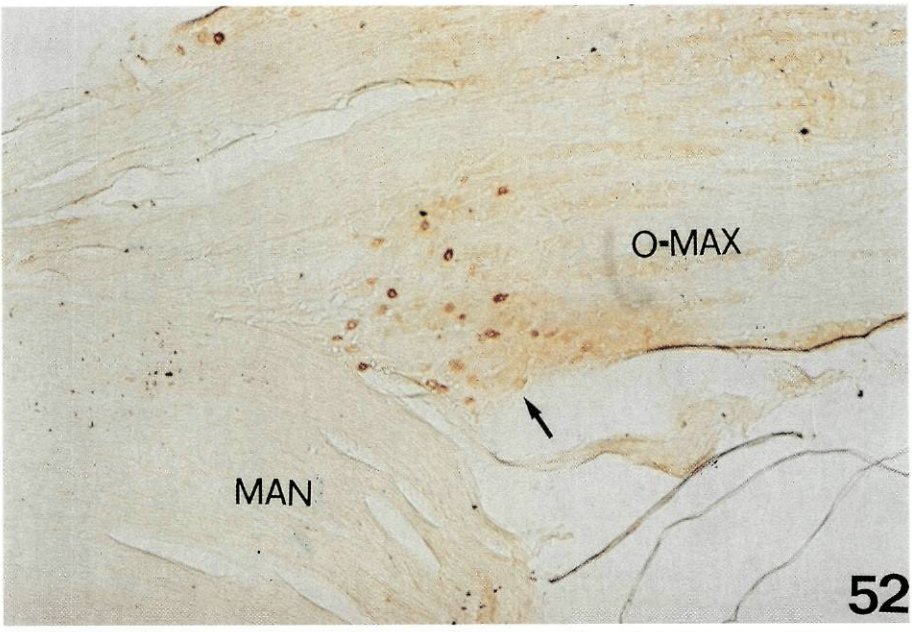
Fig. 47 – Dente de rato descalcificado. Polpa radicular. Plexo NPY-IR à volta de um vaso (seta). x 374.

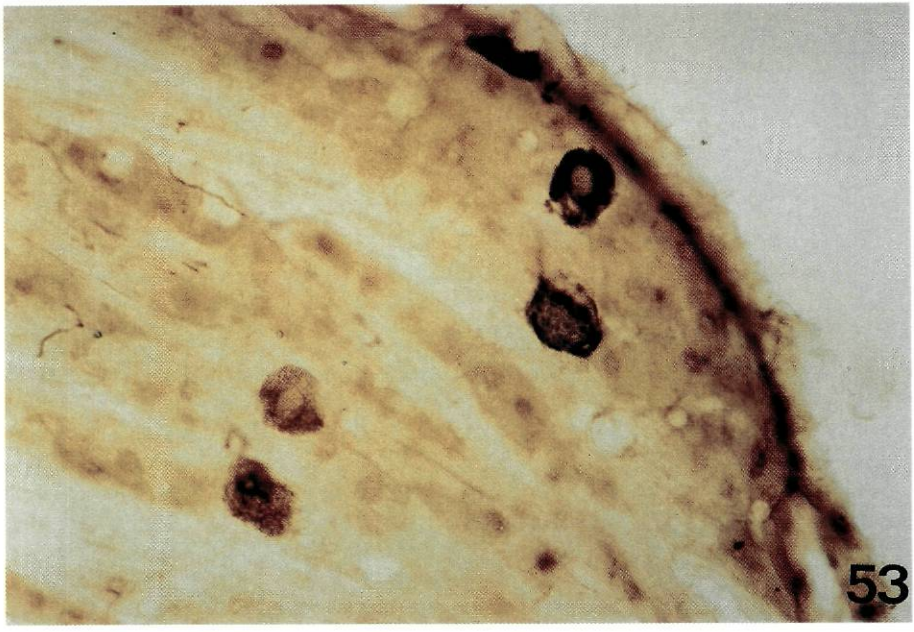


Figs. 48-49 – Bolbo raquidiano. C-*fos*. Na *figura 48*, corte ao nível do subnúcleo caudal do núcleo espinal do trigémeo (Vc) de rato não estimulado. As reacções no núcleo do tracto solitário (Sol), oliva inferior, (IO) e na parte dorsolateral do bolbo ventrolateral caudal (IRF) são dependentes da anestesia. x 16,5. Na *figura 49*, mesmo nível bulbar após estimulação térmica nóxica. Activação do c-*fos* nas lâminas I e II da zona dorsomedial do subnúcleo caudal (Vc) ipsilateral (seta). x 13,7.



Figs. 50-51 – C-*fos*. Na *figura 50* (bolbo raquidiano), zona de transição do subnúcleo caudal do trigémeo para o subnúcleo interpolar (Vi/Vc) após estimulação térmica nóxica. Além da reacção na zona dorsomedial (seta alta), reacção na zona ventromedial (seta baixa). x 16,5. Na *figura 51* (medula-espinal), primeiro segmento cervical (C1) após estimulação térmica nóxica. Reacção nas lâminas superficiais do corno dorsal ipsilateral (seta) e na lâmina X acima do canal ependimário. x 16,5.





Figs. 52-53 – Células CTb-IR no gânglio semilunar do rato após injecção de CTb no primeiro molar superior. ABC e DAB. Em *52*, as células que inervam aquele dente situam-se entre as divisões mandibular (MAN) e oftálmico-maxilar (O-MAX) do gânglio na parte inferior do início desta divisão (seta). x 46. Em *53*, aspecto granular do precipitado citoplasmático de DAB em células grandes. x 230.

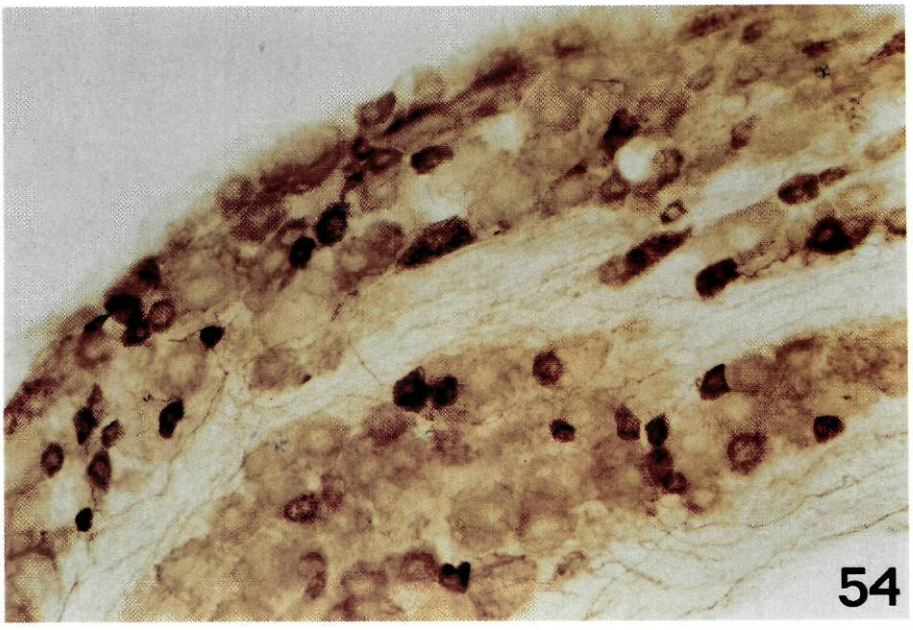
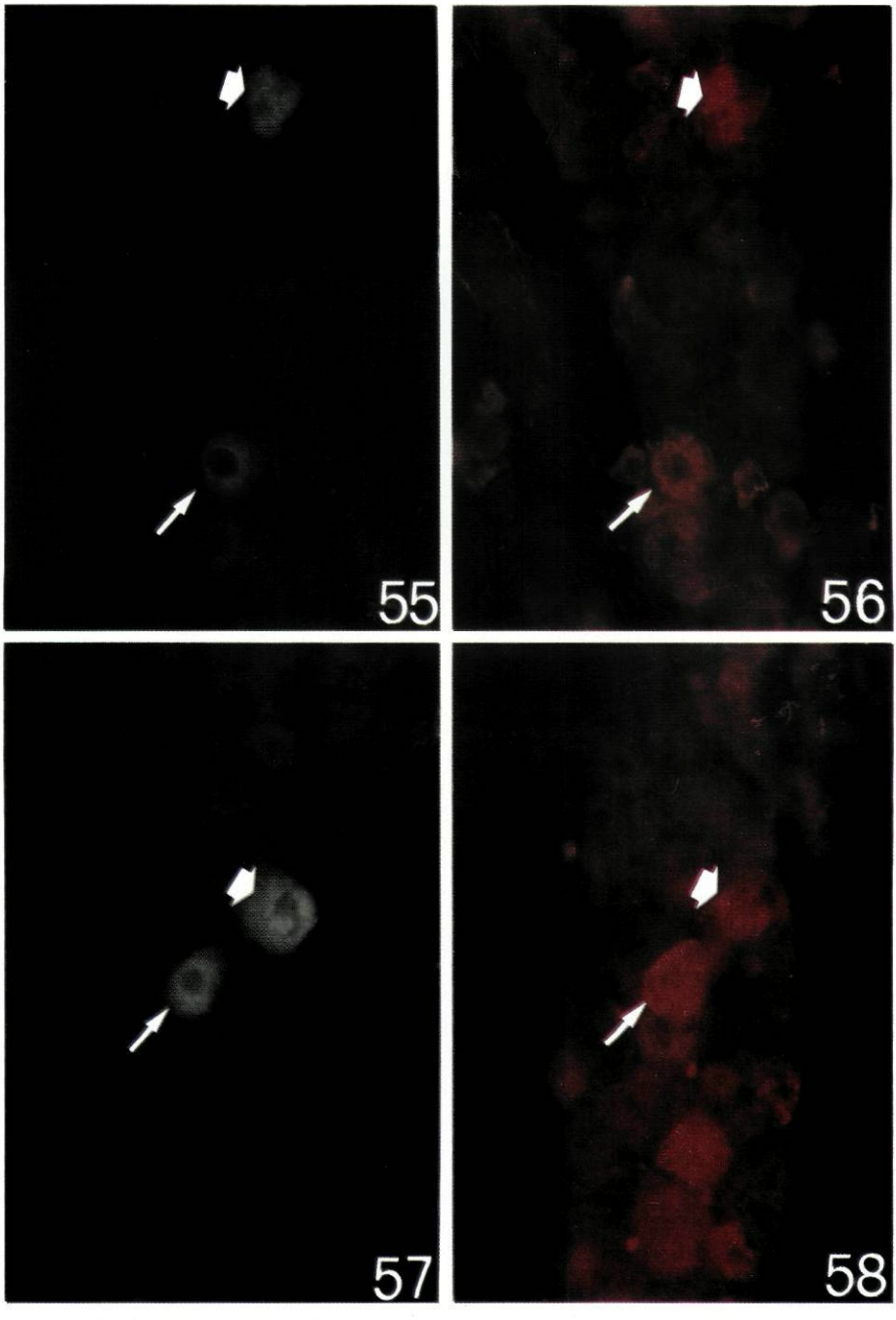
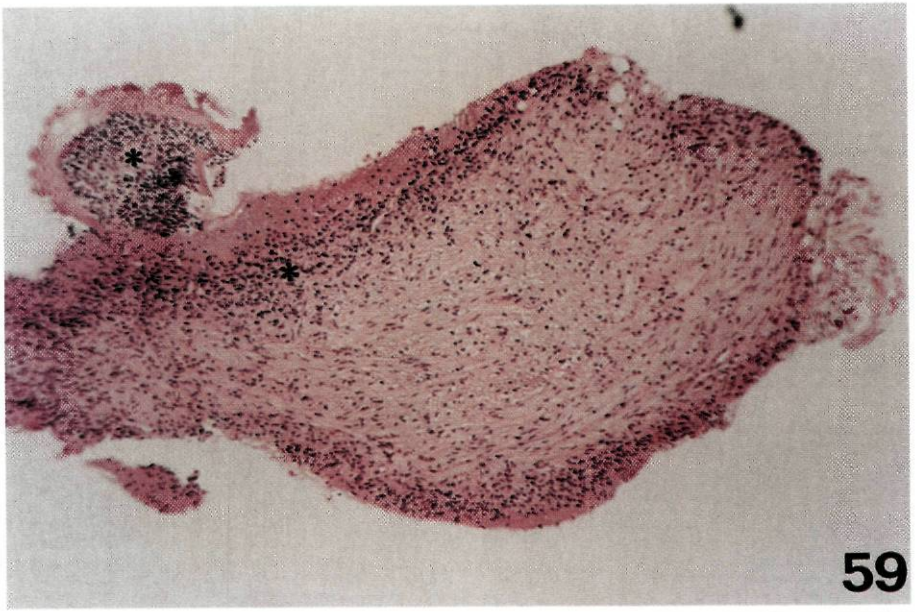
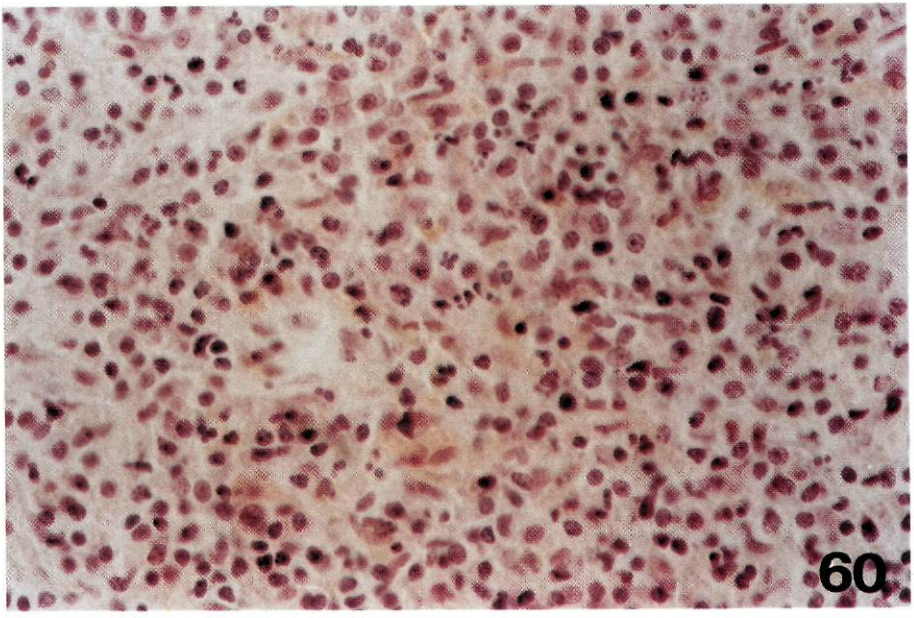


Fig. 54 – Células CGRP-IR pequenas e de tamanho médio ocupando uma extensa área da divisão oftálmico-maxilar do gânglio semilunar. ABC e DAB. x 230.

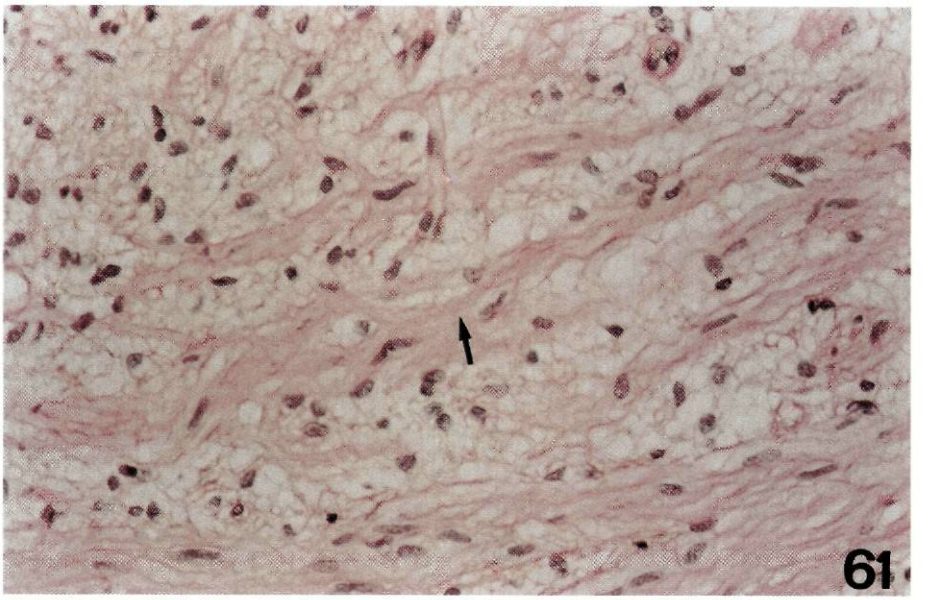


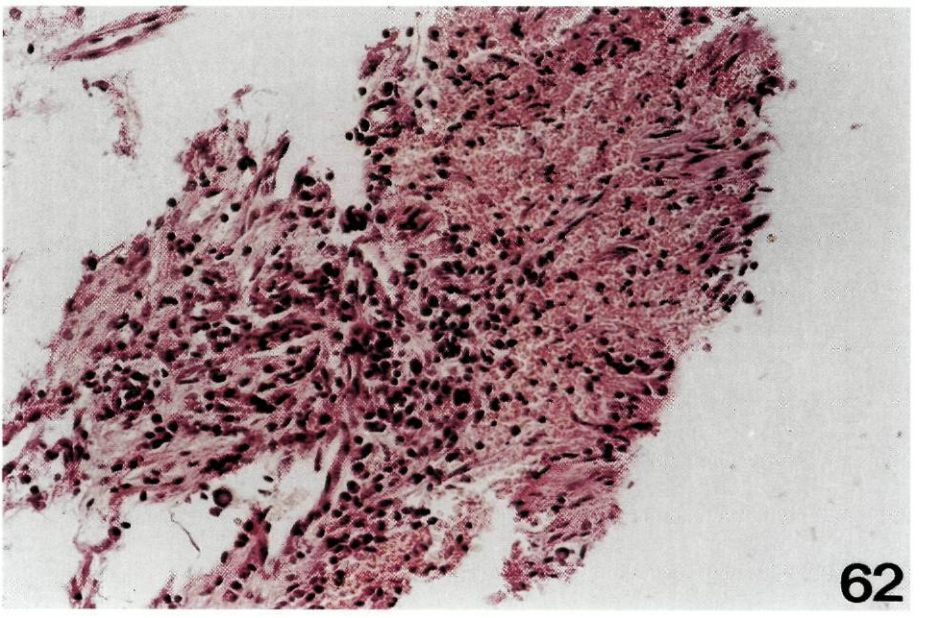
Figs. 55-58 – Gânglio semilunar. Imunofluorescência com luz de excitação para fluoresceína à esquerda, rodamina à direita. Nas *figuras 55-56*, duas células ganglionares (setas) duplamente imunocoradas para CTb (verde) e CGRP (vermelho). Nas *figuras 57-58*, duas células (setas) duplamente imunocoradas para CTb (verde) e SP (vermelho). x 492.



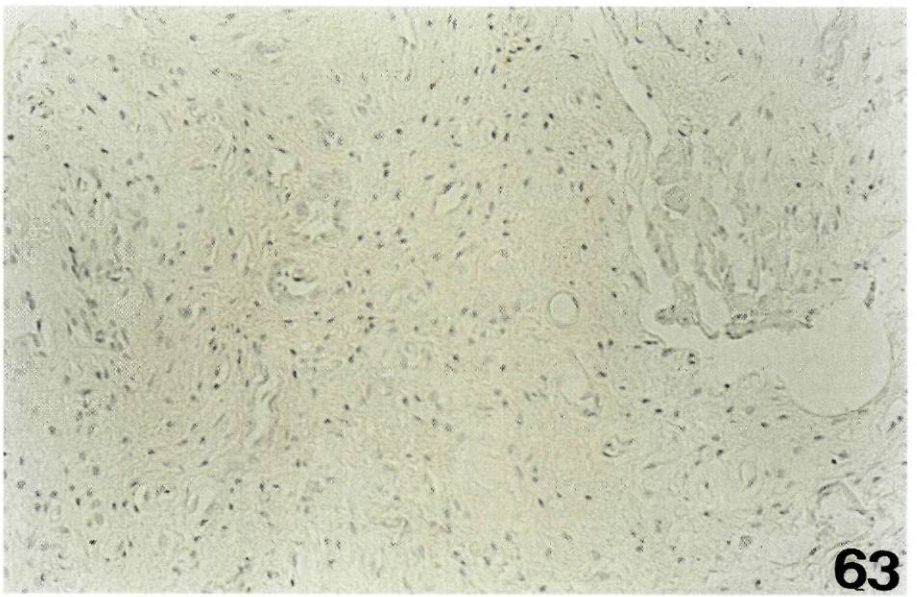


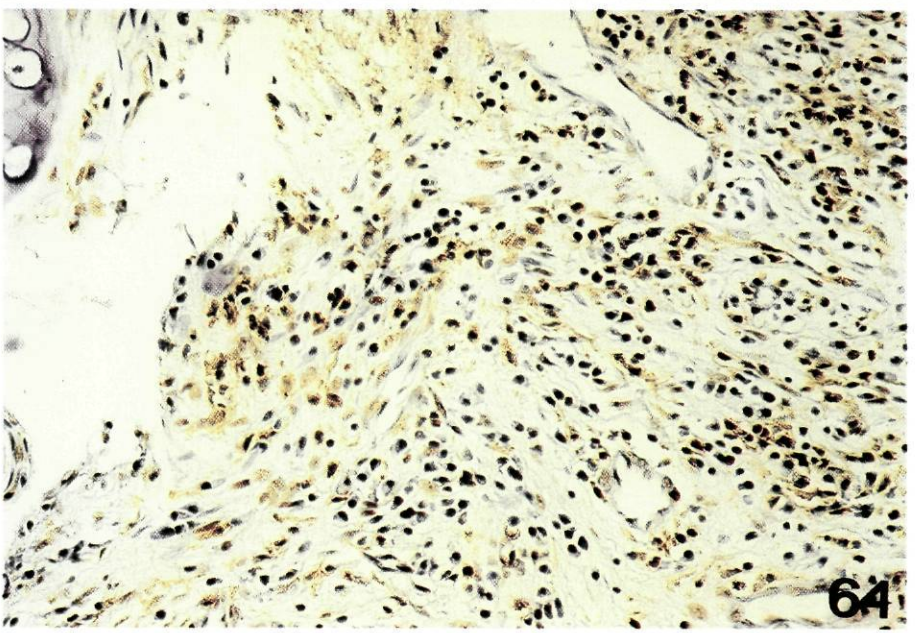
Figs. 59-60 – Cárie. Polpa extraída sem descalcificação. HE. Em *59*, infiltrado inflamatório moderado em cárie superficial (*) x 73. Em *60*, pormenor do infiltrado. x 453.



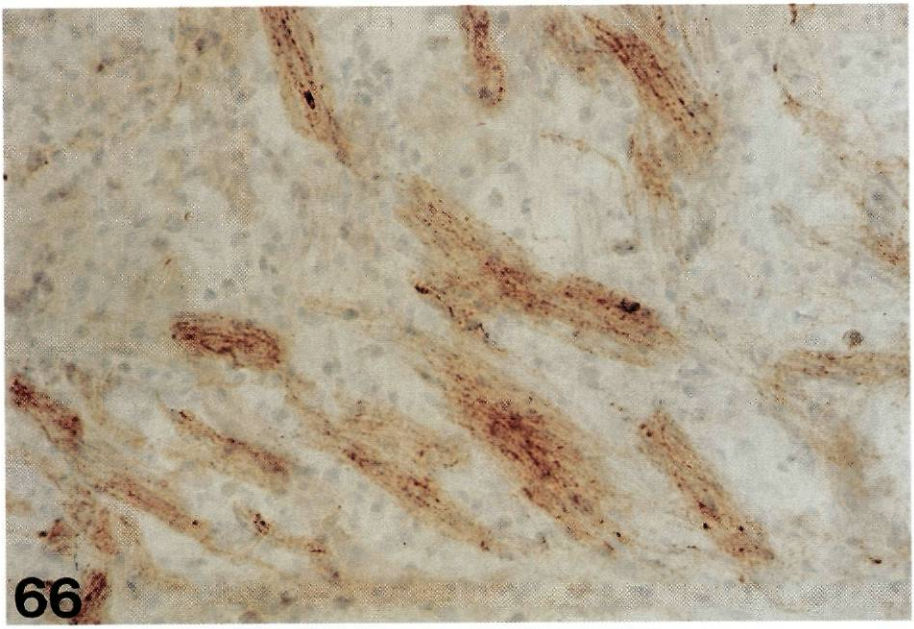


Figs. 61-62 – Cárie profunda. Polpa de dente não descalcificado. HE. Em *61*, detalhe de vasos de proliferação (seta) e acentuado edema. x 366. Em *62*, marcado infiltrado inflamatório e acentuada congestão. x 230.

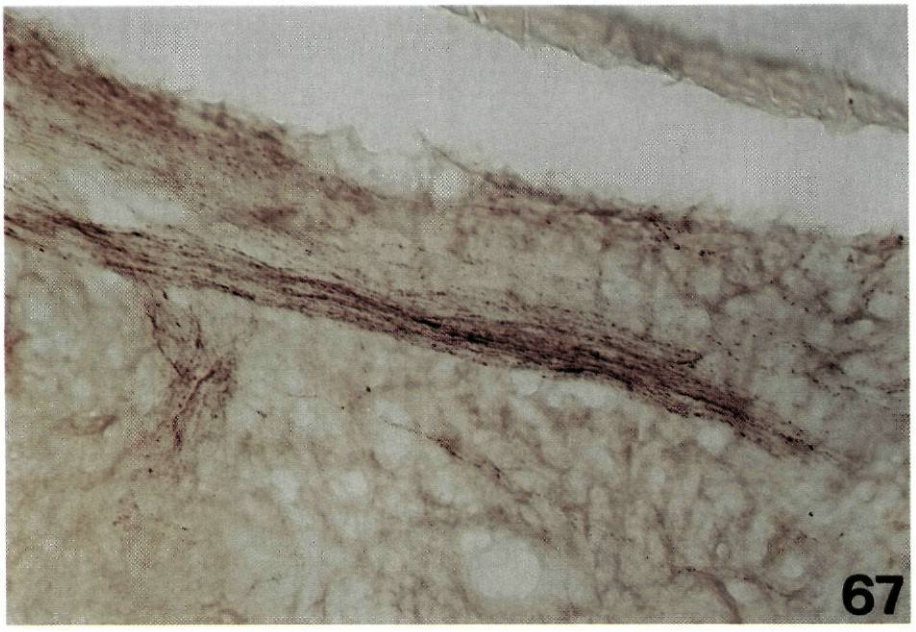


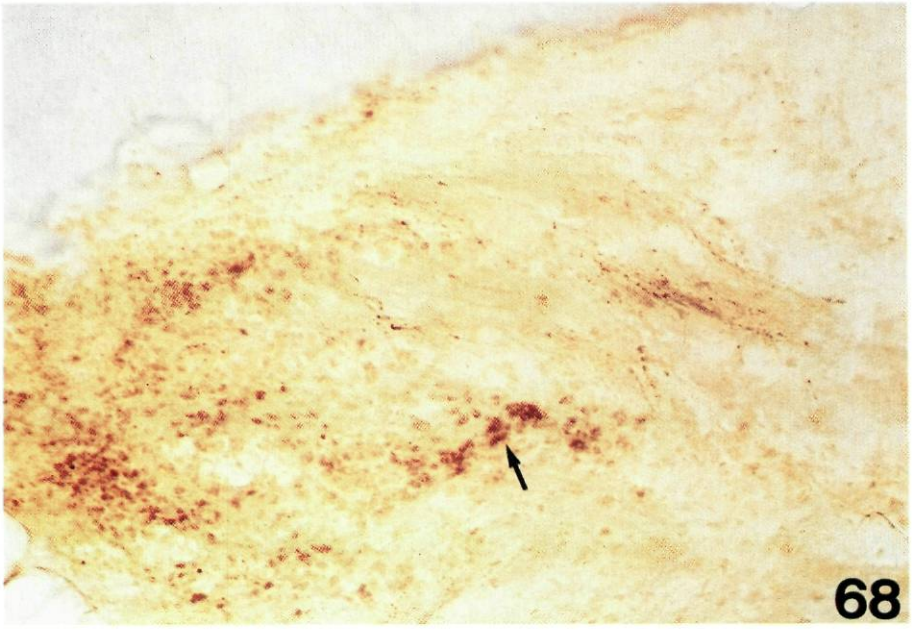


Figs. 63-64 – Cárie. Dente humano não descalcificado. X 230. Em *63*, imunocoloração com anticorpo anti-células B e hemateína. Em *64*, imunocoloração com anticorpo anti-células T e hemateína. Numerosos linfócitos T castanhos.

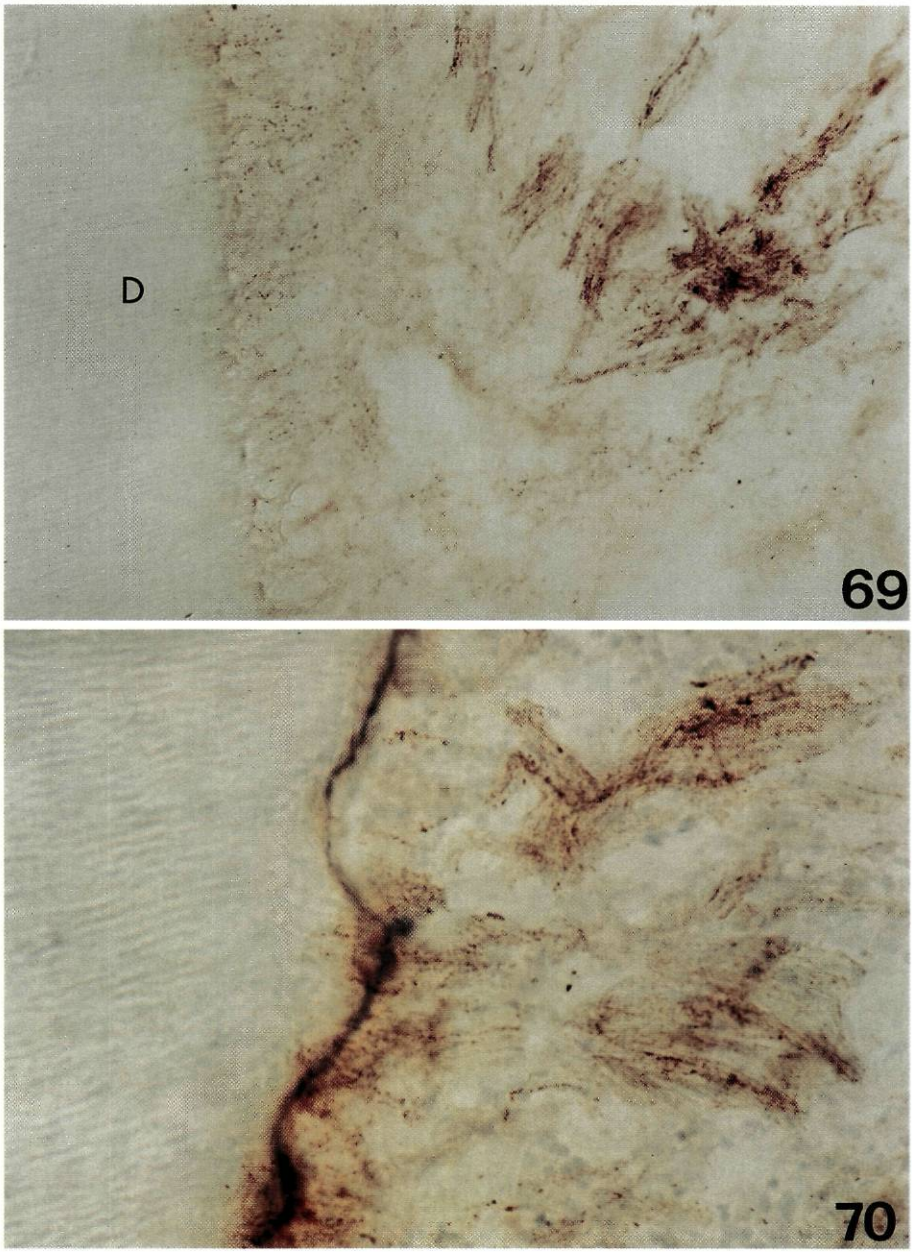


Figs. 65-66 – Cárie. Dentes descalcificados. CGRP. Em *65* (x 115) e em *66* (x 230), feixes nervosos grossos e compactos na polpa.





Figs. 67-68 – Cárie. Dentes descalcificados. CGRP. x 230. Em *67*, feixe vásculo-nervoso. Em *68*, macrófagos com CGRP fagocitado (seta).



Figs. 69-70 – Cárie. Dentes descalcificados. CGRP. Escassa penetração dentinária (D – dentina) das fibras sensitivas. x 230.

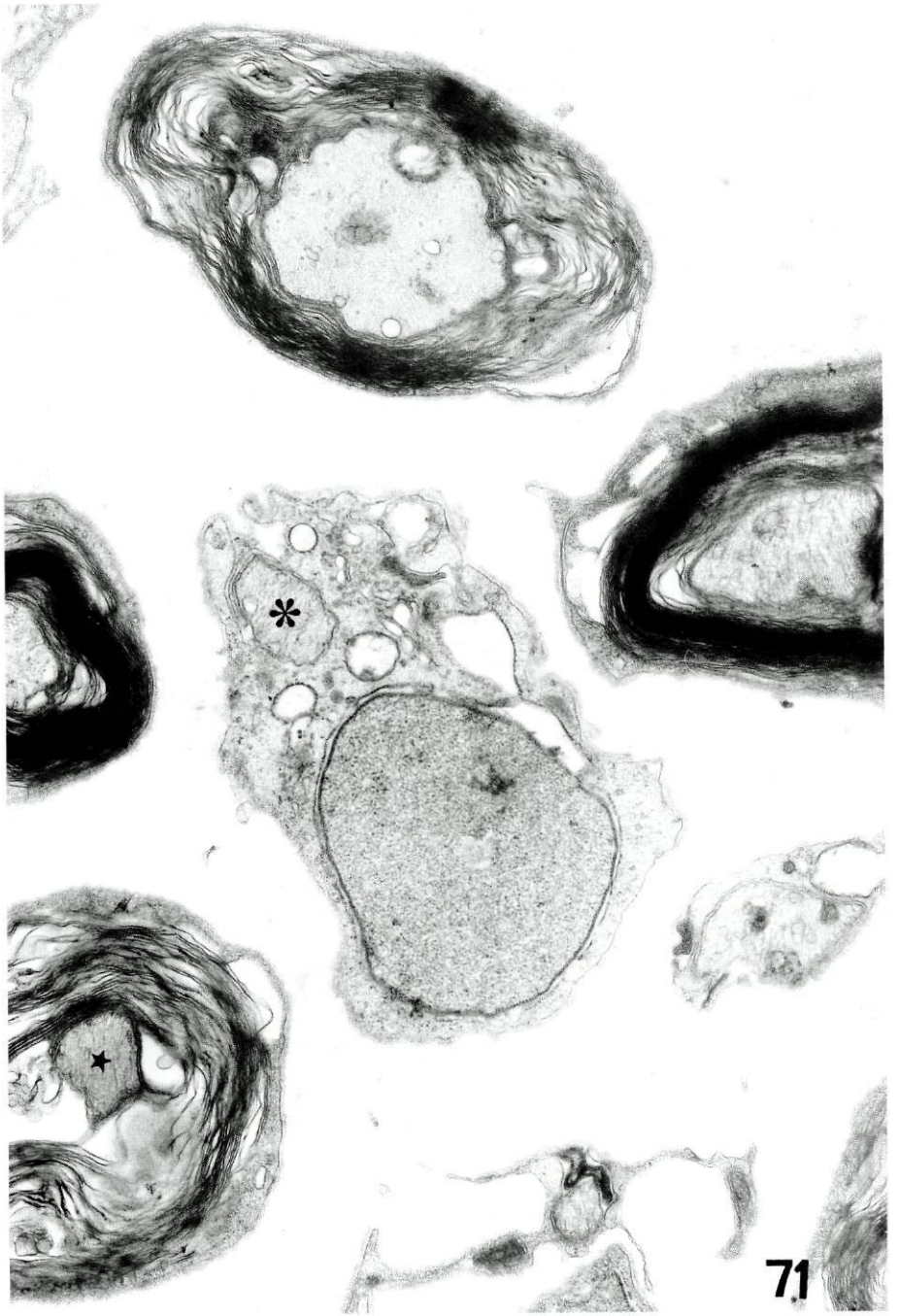


Fig. 71 – Cárie. Fibras nervosas da polpa. Densificação axonal (estrela) e distorsão mielínica. Célula de Schwann levemente distrófica com fibra amielínica densificada (*). ME. x 13.407.

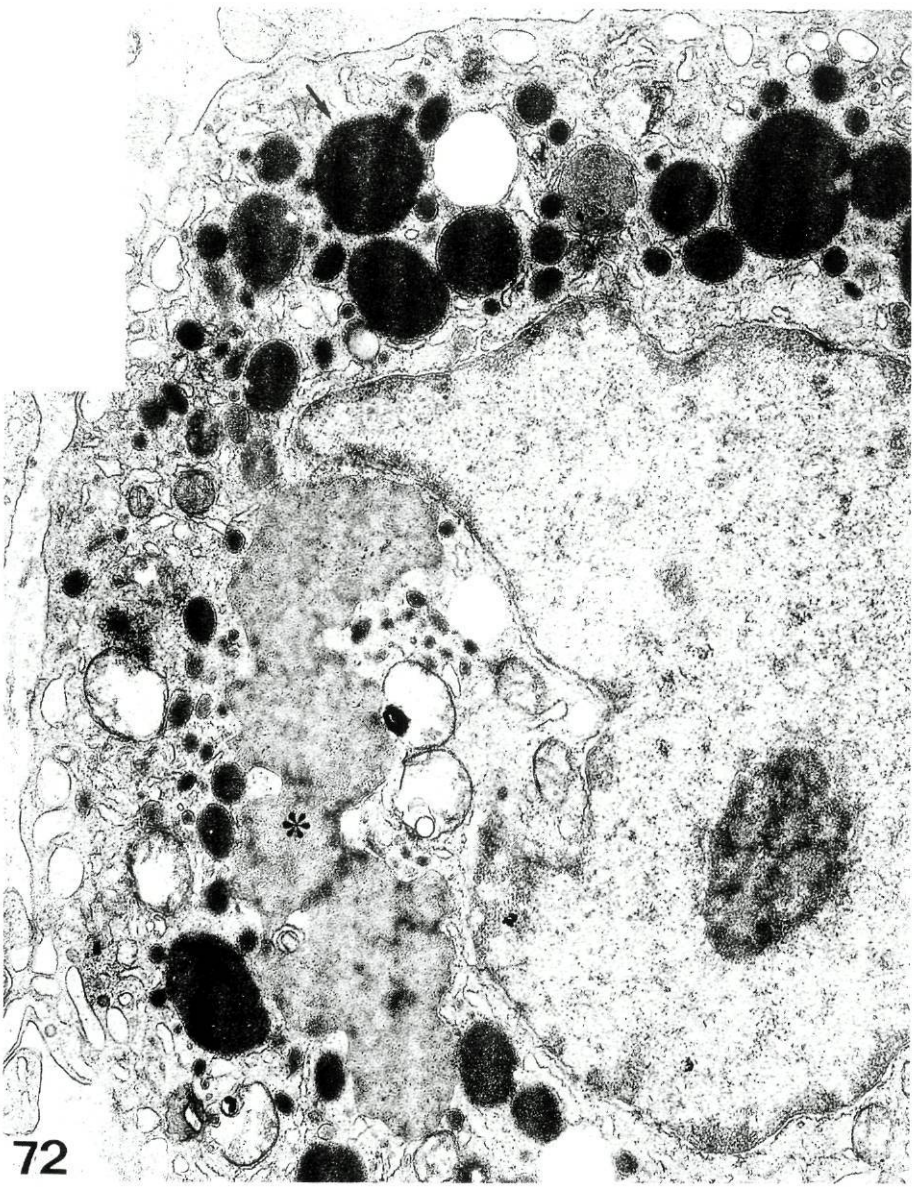
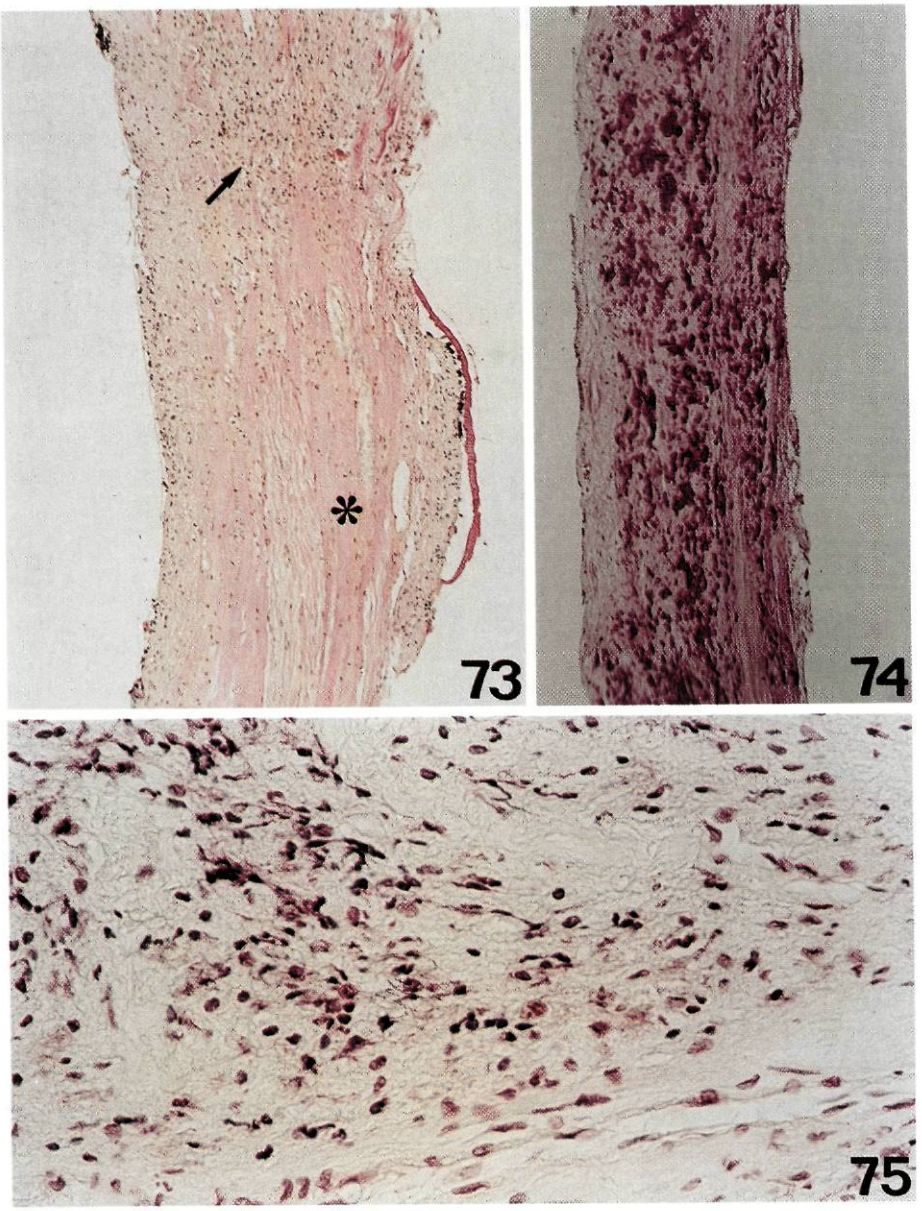
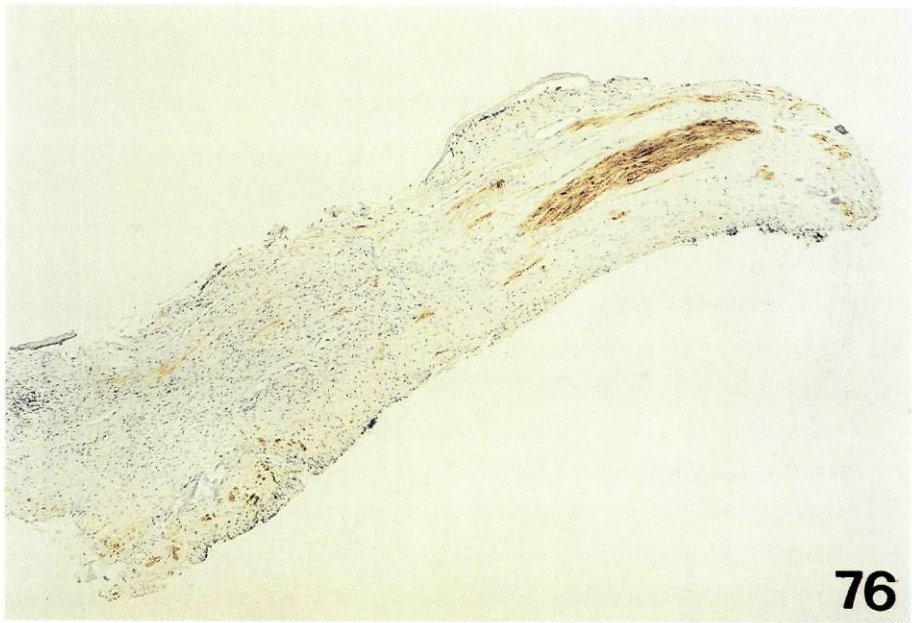


Fig. 72 – Cárie. Macrófago na polpa com mielina fagocitada (*) e vacúolos densos com figuras mielínicas (seta). ME. x 14.443.

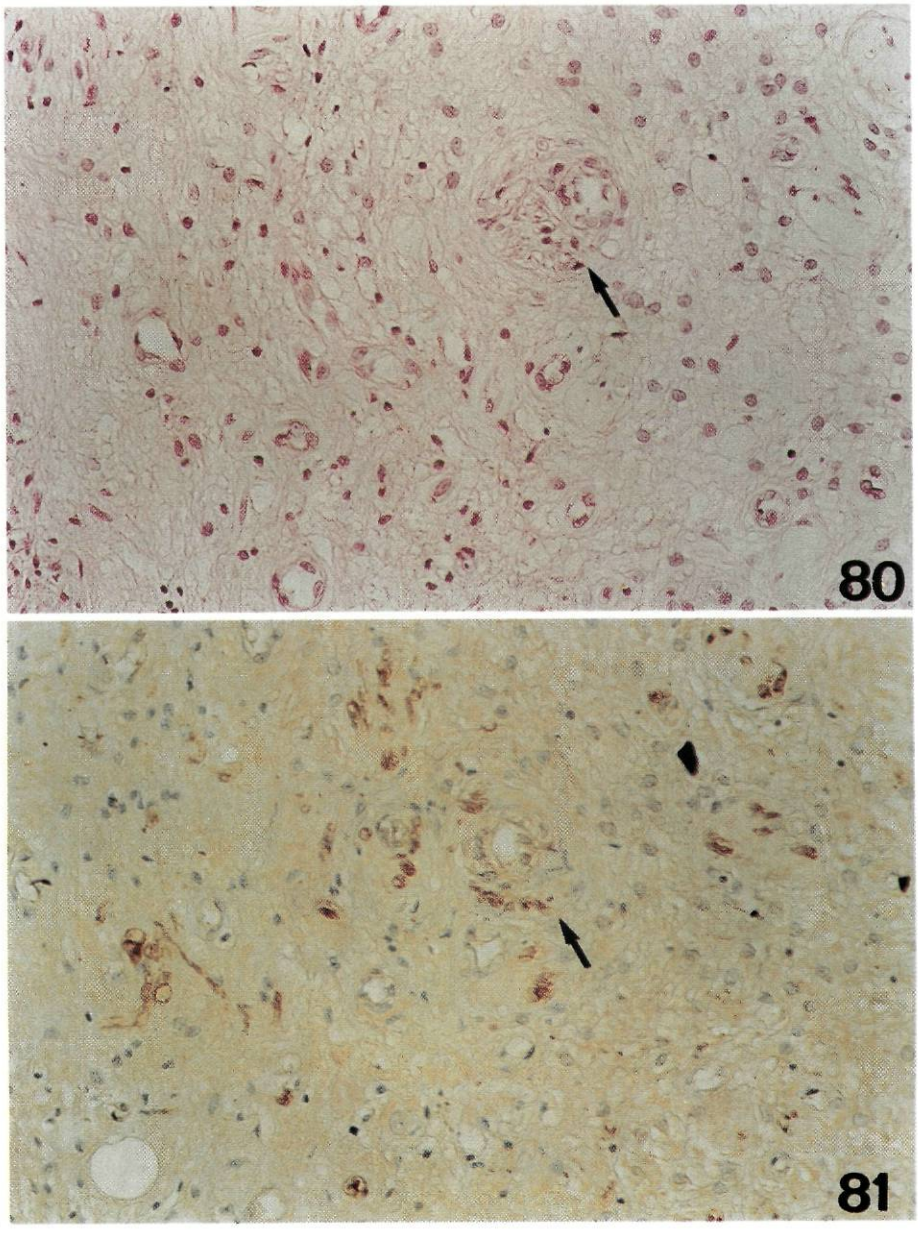


Figs. 73-75 – Periodontose. Incisivos sensíveis. Corte longitudinal da polpa. HE. Em *73*, zona radicular com abundante esclerose (*), infiltrado inflamatório na parte mais alta (seta), escassez de pulpócitos. x 75. Em *75*, pormenor do infiltrado. x 366. Em *74*, abundante mineralização distrófica, noutra polpa. x 75.



Figs. 76-77 – Periodontose. Incisivos sensíveis. S-100. Em *76*, feixes vásculo-nervoso na polpa radicular à direita. Câmara pulpar à esquerda muito atrofiada com infiltrado inflamatório e quase sem nervos. x 181. Em *77*, câmara pulpar atrófica noutro dente, com inervação relativamente bem conservada e focos de calcificação. x 461.

Figs. 78-79 – Periodontose. Molar sensível. ME. Nervos mielínicos na câmara pulpar atrófica. Na *figura 78*, densificação axoplásmica ligeira. x 14.443. Na *figura 79*, maior destruição do axoplasma e marcada distrofia da mielina. x 9.700.



Figs. 80-81 – Periodontose. Molares insensíveis. X 230. Em *80*, câmara pulpar com atrofia moderada, escassos pulpócitos, linfócitos, um feixe vásculo-nervoso (seta) e muitos capilares. HE. Em *81*, corte adjacente ao anterior imunocorado para S-100 com escassos elementos nervosos imunocorados castanhos, quer no feixe vásculo-nervoso (seta) quer nas imediações.

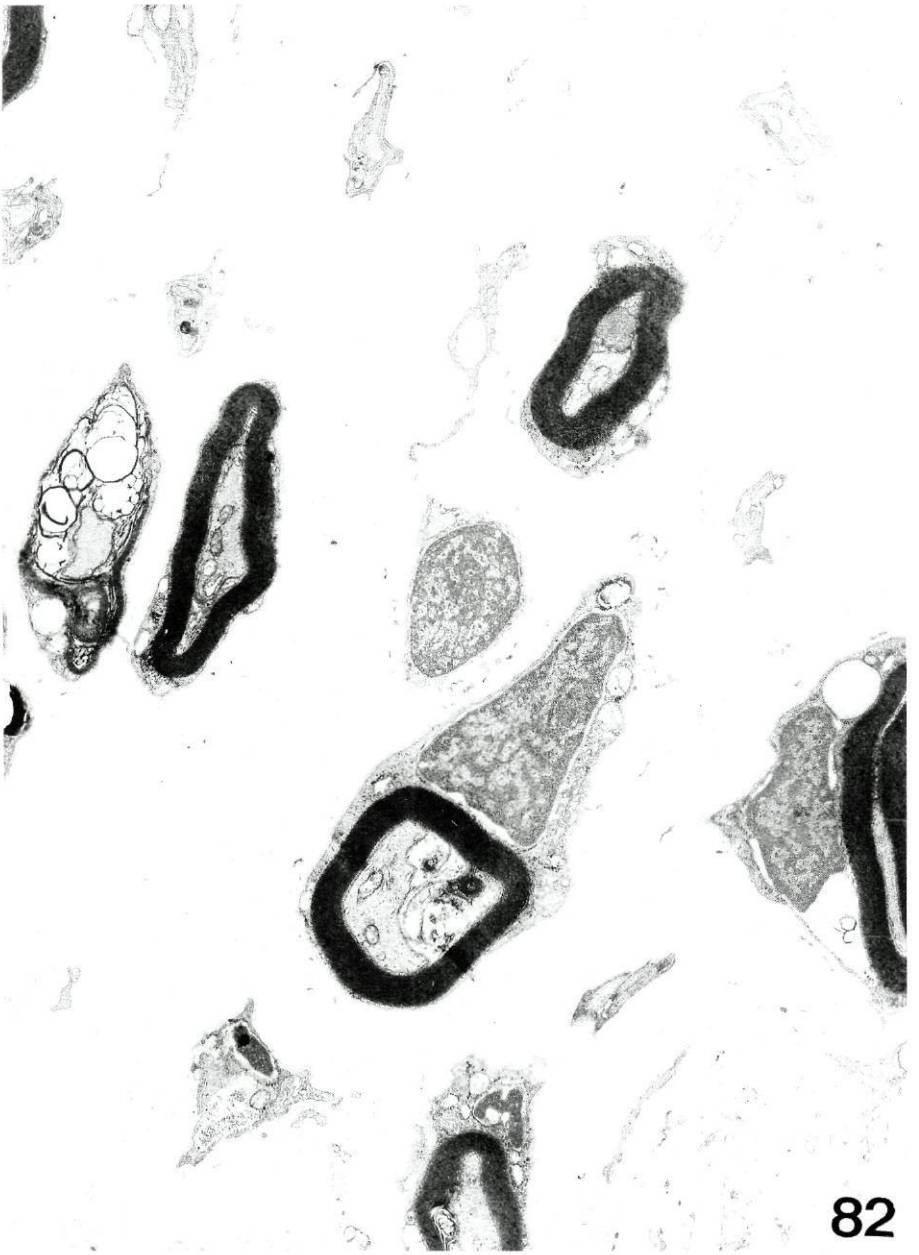
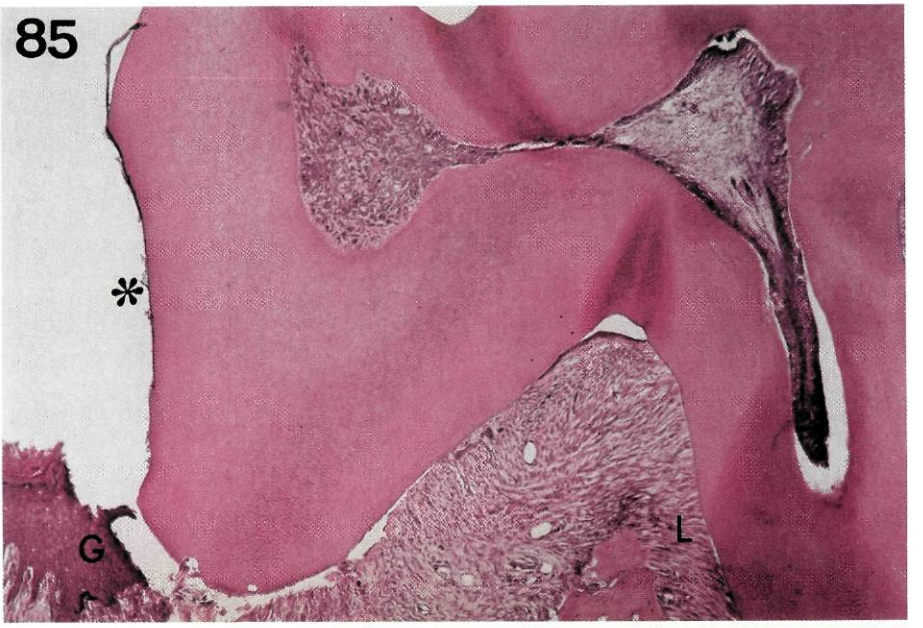
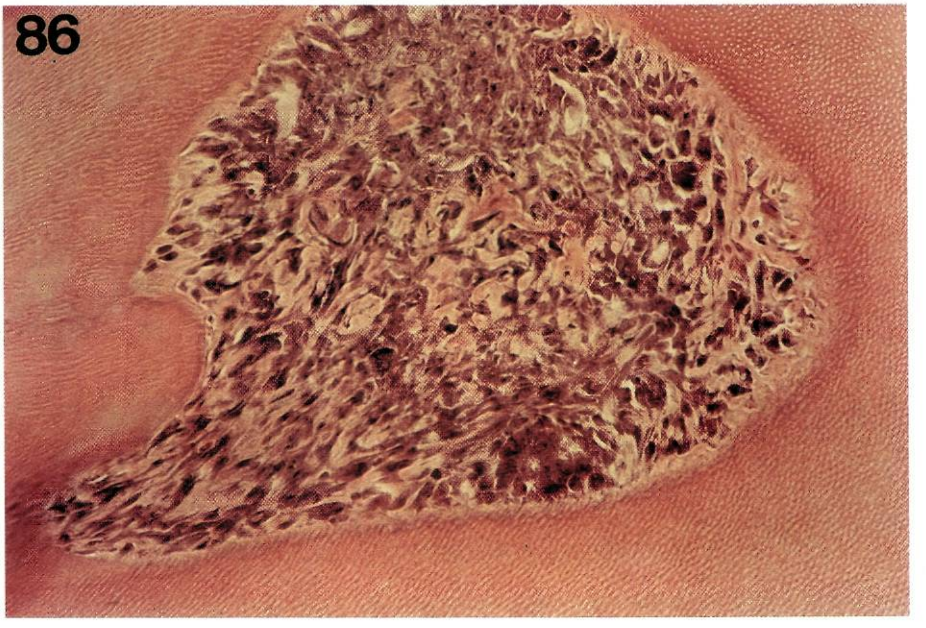


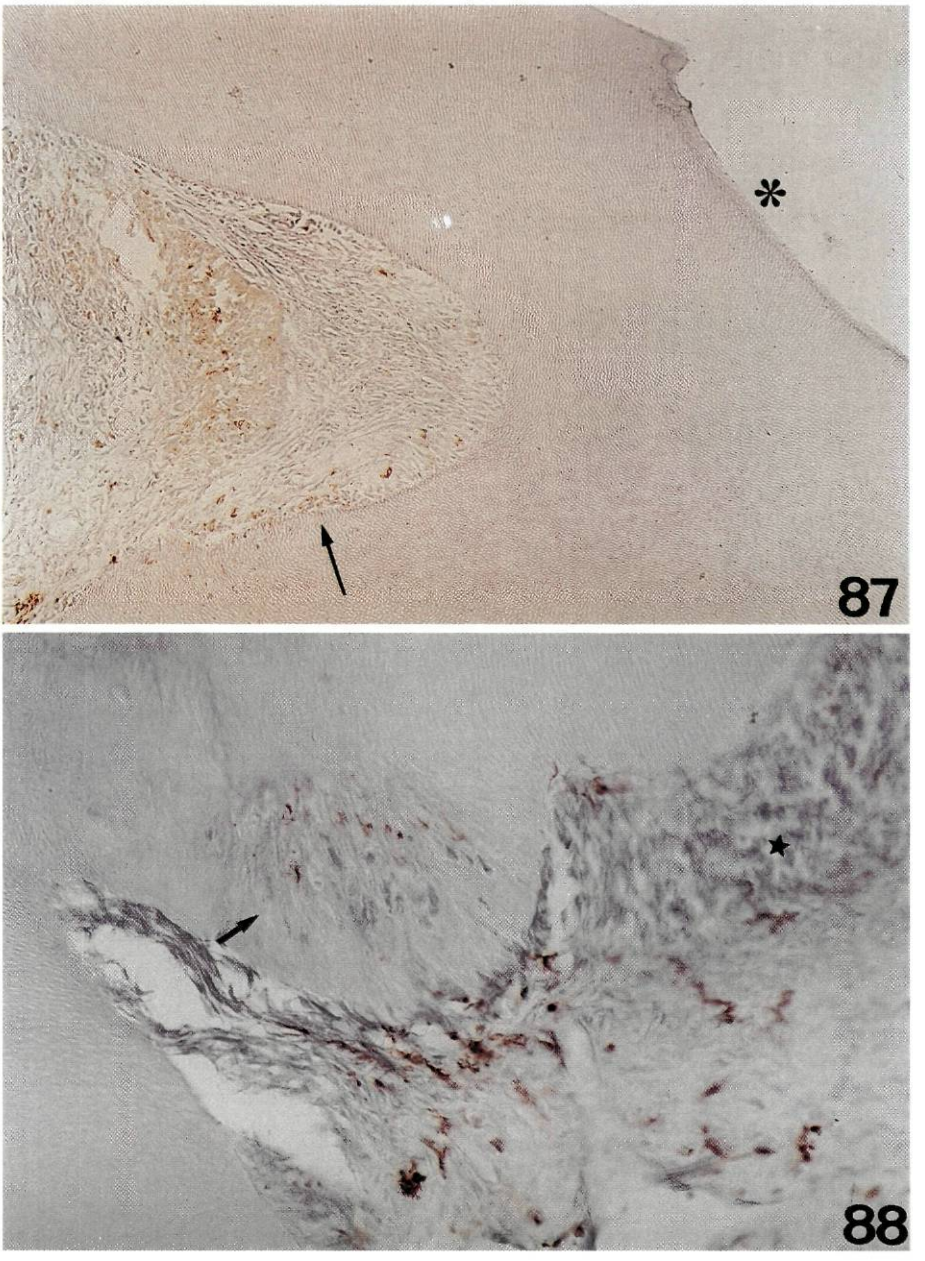
Fig. 82 – Periodontose. Molar insensível. Fibras mielínicas normais ou com moderado sofrimento axonal, fibras amielínicas menos lesadas. ME. x 8.384.

Figs. 83-84 – Periodontose. Incisivos não descalcificados. x 366. Em *83*, dente com sensibilidade dolorosa com nervos CGRP-IR na polpa radicular. Em *84*, dente insensível, acentuada diminuição do número de fibras CGRP-IR.

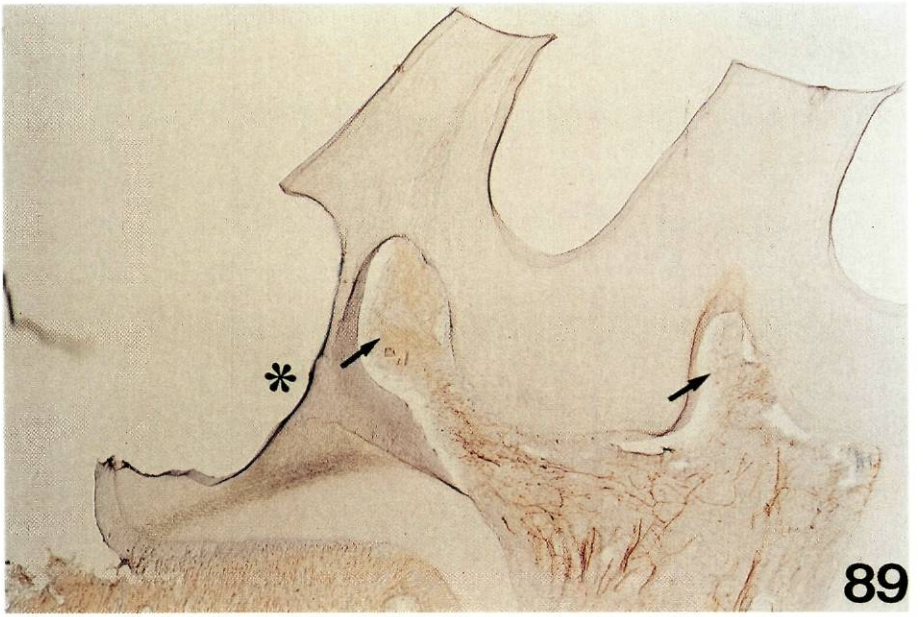




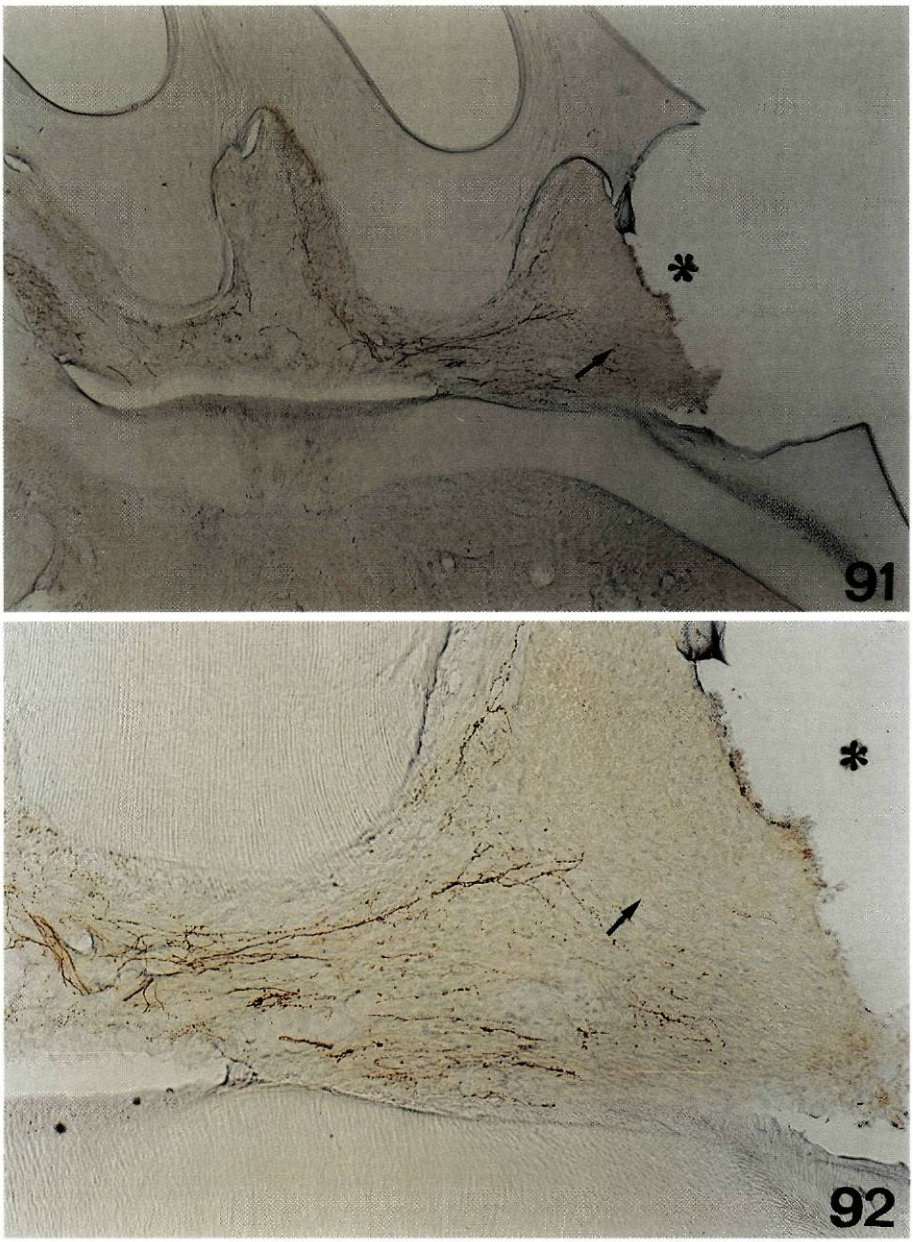
Figs. 85-86 – Cavitação experimental. HE. Em *85*, escavação superficial (*). 2 dias. G - Gengiva aderida. L – Ligamento periodontal. Destruição parcial dos odontoblastos e denso infiltrado inflamatório num corno pulpar, enquanto a polpa profunda permanece normal. x 60,4. Em *86*, pormenor do anterior. x 230.



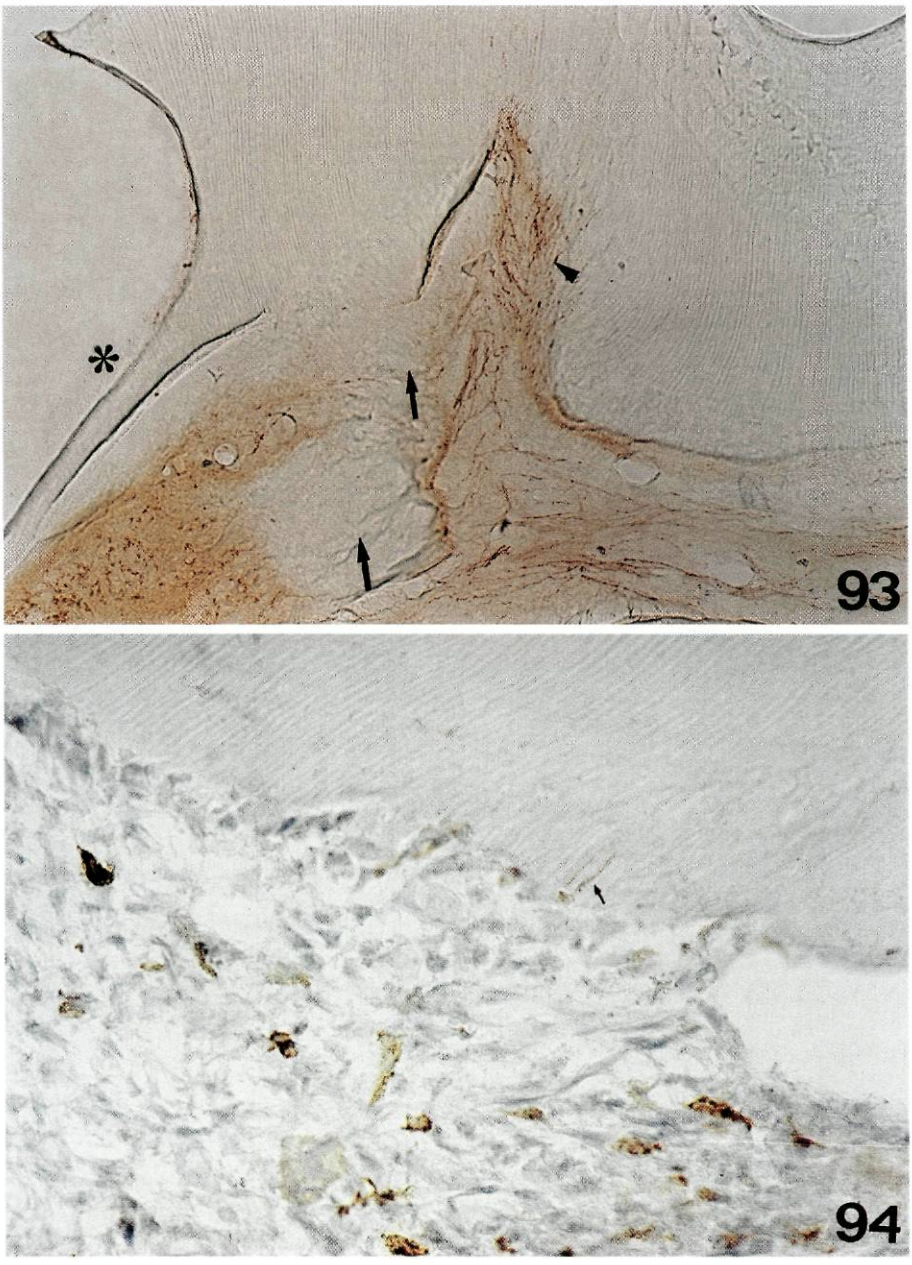
Figs. 87-88 – Cavitação experimental. Imunocoloração com OX6. Em *87*, células apresentadoras de antigénios aos 4 dias dispersas na polpa lesada (seta) subjacente à escavação (*). x 115. Em *88*, noutro dente, à 1 hora, zona de aspiração para a dentina de odontoblastos e células OX6 castanhas (seta). À direita zona de inflamação pulpar (estrela). Contraste com hematoxilina. Numerosas células OX6 dispersas pela zona inflamada e pela polpa sã. x 230.



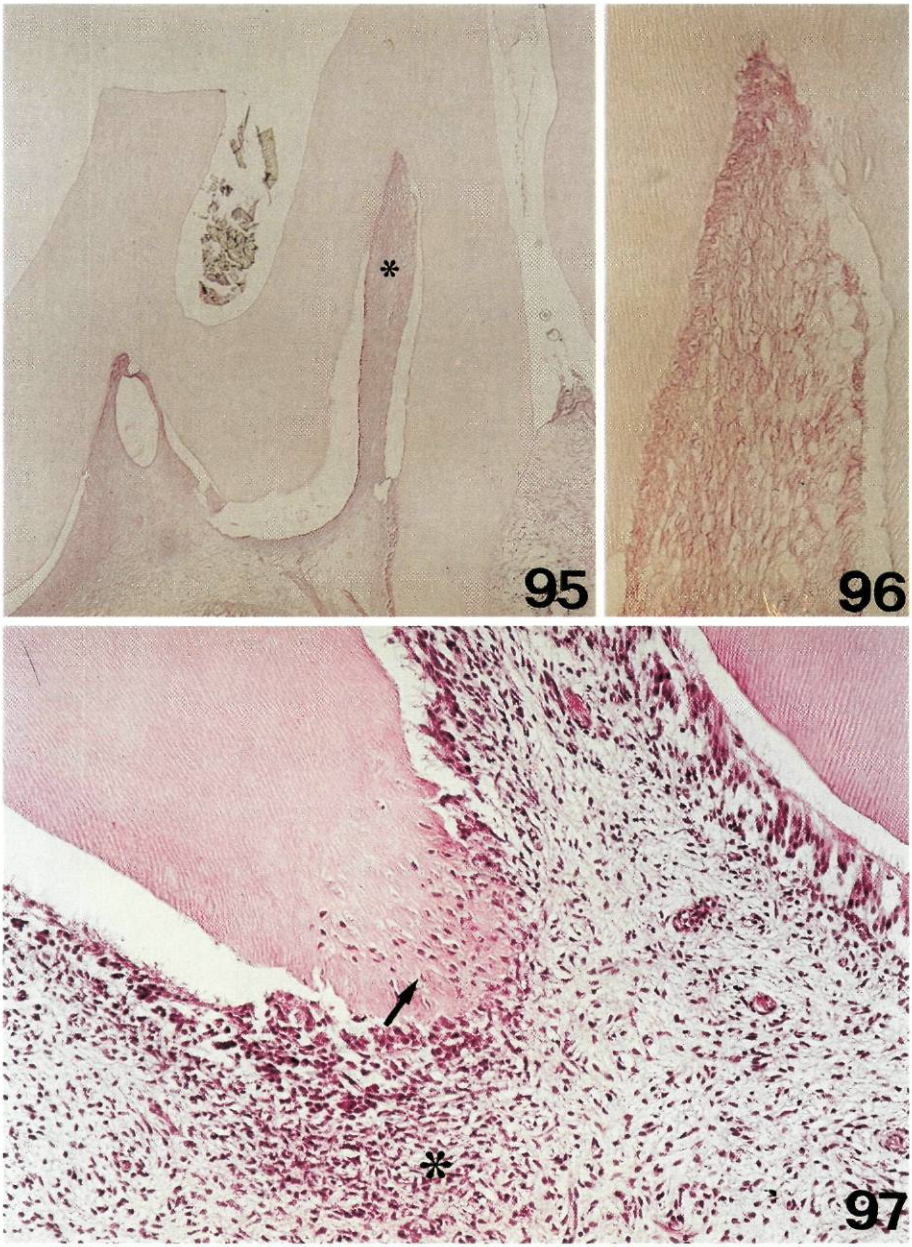
Figs. 89 (x 46) e *90* (x 115) – Cavitação experimental. Escavações profundas sem atingirem a polpa (*). CGRP. A zona superficial da polpa inflamada (setas) desprovida de fibras sensitivas que, aos 4 dias, mostram sinais de proliferação na polpa sã.



Figs. 91-92 – Cavitação experimental. CGRP. Escavação profunda (*) com exposição pulpar. 4 dias. Tal como nas figuras anteriores, as fibras sensitivas não penetram na zona inflamada (seta). Em *92* (x 115) ampliação do campo microfotografado em *91* (x 46).



Figs. 93-94 – Cavitação experimental. Escavação profunda sem exposição pulpar (*). 10 dias. Em *93*, CGRP, fibras sensitivas distribuídas pelo corno apical já sem infiltrado inflamatório (cabeça de seta), mas excluídas de dois focos de dentina reparadora (setas). x 115. Em *94*, OX6. Numerosas células apresentadoras de antigénios castanhas na polpa cicatrizada, algumas invadindo os túbulos dentinários (seta). x 366.



Figs. 95-97 – Estimulação térmica nóxica. HE. Em *95*, polpa coagulada (*) nos cornos pulpares às 2 horas. x 46. Em *96*, detalhe da zona coagulada. x 183. Em *97*, noutro dente, às 3 horas, infiltrado inflamatório (*) e aspiração para a dentina (seta). x 183.

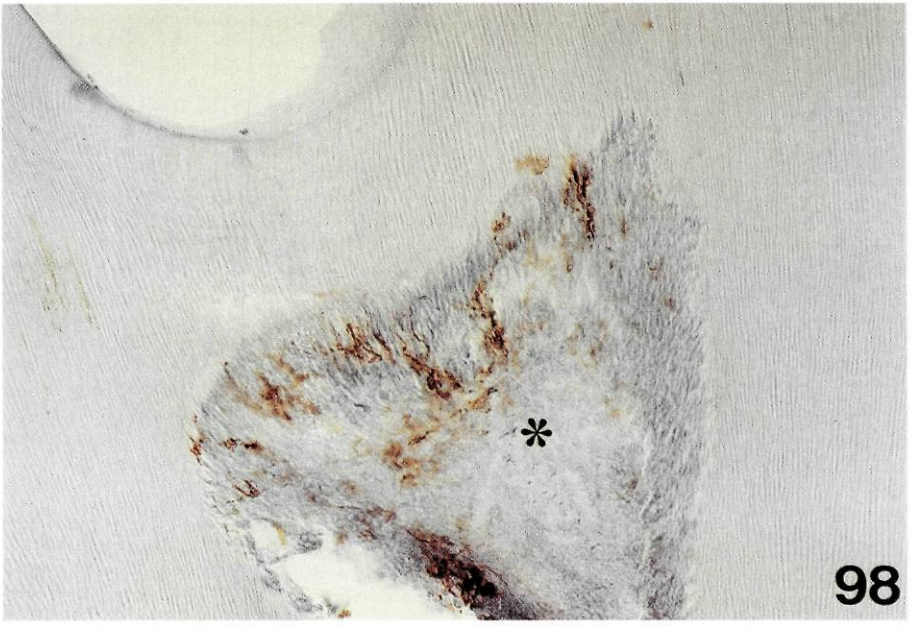
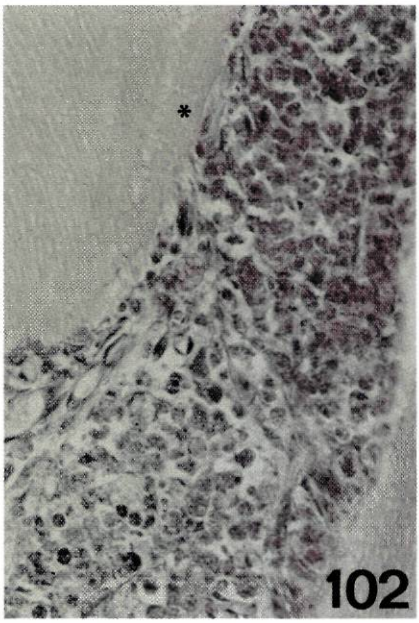
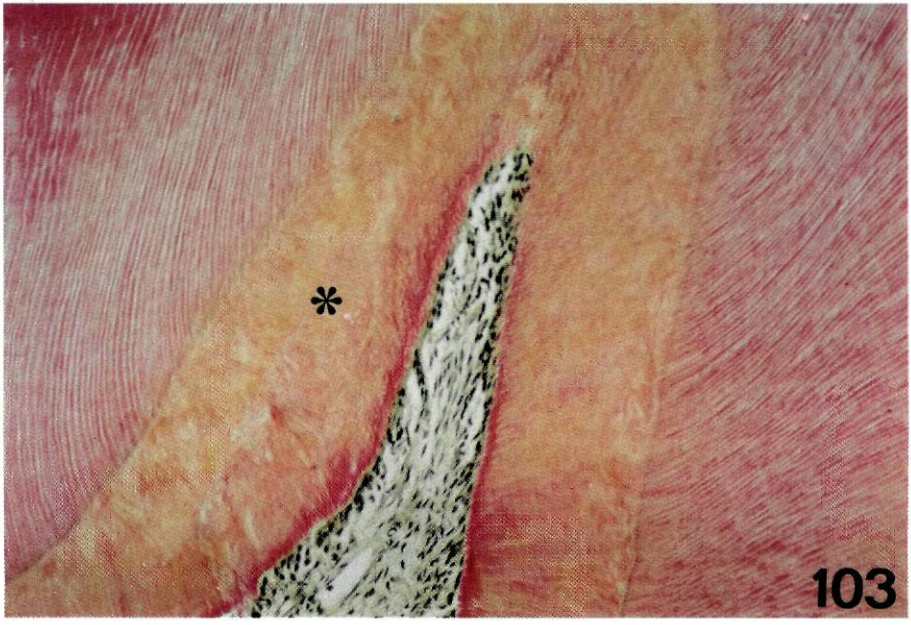


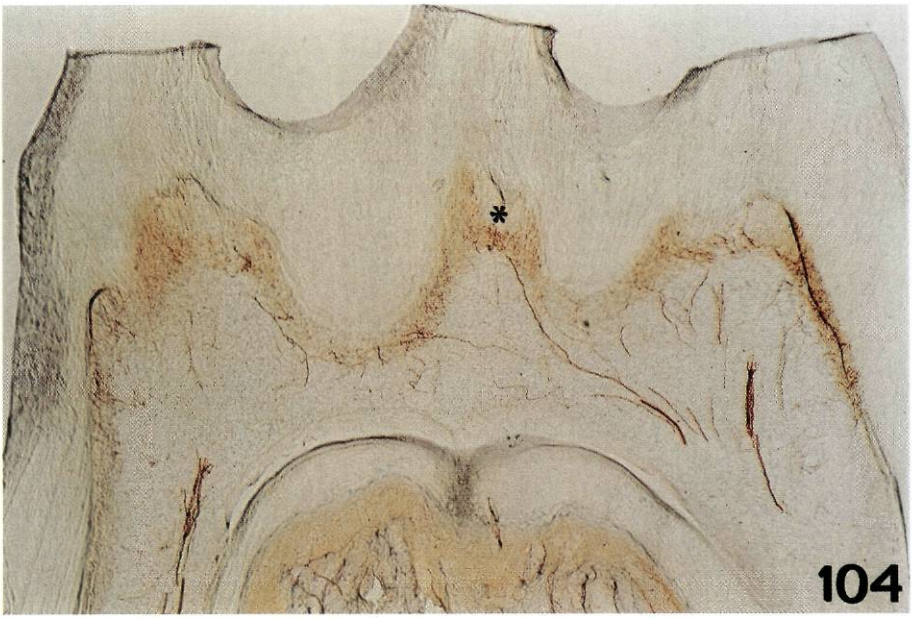
Fig. 98 – Estimulação térmica nóxica. 4 horas. OX6 e hemateína. Zona coagulada (*) que aqui poupou os odontoblastos em cima e à direita mas não à esquerda. Numerosas células apresentadoras de antigénios castanhas. x 183.

Figs. 99-100 – Estimulação térmica nóxica. CGRP. Zonas pulpares coaguladas (*). Em *99*, às 4 horas, ausência de nervos sensitivos na zona coagulada. x 115. Em *100*, aos 4 dias, grande proliferação nervosa na polpa sã não invadindo ainda a zona coagulada. x 60.





Figs. 101-103 – Estimulação térmica nóxica. Em *101* (x 103) e *102* (x 366), a zona previamente coagulada já totalmente ocupada por infiltrado inflamatório, aos 7 dias. Faixa de dentina reparadora (*). HE. Em *103*, polpa inteiramente cicatrizada aos 20 dias. Espessa camada de dentina reparadora (*). PAS e hemateína. x 103.



Figs. 104-105 – Estimulação térmica nóxica. CGRP. Em *104*, intensa proliferação nervosa, aos 12 dias, à volta de focos inflamatórios residuais (*). x 46. Na *figura 105*, 20 dias, corno pulpar totalmente cicatrizado e reinervado (seta). No da direita persiste grande foco de dentina reparadora (*) desnervado. x 46.

Fig. 106 – Estimulação térmica nóxica. OX6. Numerosas células apresentadoras de antigénios castanhas no corno pulpar totalmente cicatrizado aos 20 dias. Faixa de dentina reparadora (*). x 183.

Errata

Pág.	*Linha*	*Onde se lê*	*Deve ler-se*
55	19	Cotta Pereira	Cotta-Pereira
60	18	*anterógrada*	*retrógrada*
99	22	dentina	polpa
103	2	das duas semanas	da segunda semana