

## ***Uso de uma técnica histológica adequada para análise microscópica dos tecidos corono-radulares de dentes permanentes, variando-se a solução descalcificadora***

***Lucas da Fonseca Roberti Garcia***<sup>1</sup>

***Ruberval Armando Lopes***<sup>2</sup>

***Heid Sueli Lene dos Santos***<sup>3</sup>

***Melissa Albanese Mezzena***<sup>4</sup>

### ***Resumo***

A escolha do fixador e do tempo de fixação, a técnica de descalcificação e as soluções usadas com esse objetivo são fatores importantes na obtenção de uma preparação correta para as mais diversas análises ao microscópio de luz. Assim, no presente trabalho de pesquisa, foi selecionada a técnica mais adequada de preparo de cortes histológicos para dentes permanentes, variando-se as soluções descalcificadoras. Para tanto, 8 terceiros molares humanos recém-extraídos, divididos randomicamente em 2 grupos de 4 dentes, foram fixados durante 7 dias em uma solução de Formol à 10% e, em seguida, descalcificados por um período de 27 dias em uma solução de Ácido Nítrico a 4% (Grupo I) e 42 dias em uma solução de Citrato de Sódio a 20% + Ácido Fórmico a 30%, em partes iguais (Grupo II). As etapas laboratoriais seguintes foram àquelas utilizadas rotineiramente e a coloração, segundo as técnicas da Hematoxilina-Eosina e do Tricrômico de Gomori. Os cortes histológicos assim obtidos foram selecionados, analisados microscopicamente e fotografados. Pôde-se, assim, concluir, a partir dos resultados obtidos pela análise microscópica, que a técnica Histológica com a solução descalcificadora constituída pelo Citrato de Sódio a 20% + Ácido Fórmico a 30% obteve melhor desempenho, pois apresentou uma preservação mais satisfatória dos tecidos dentais observados.

***Palavras-chave:*** tecidos dentais; soluções descalcificadoras;; técnica histológica.

### ***INTRODUÇÃO***

Os dentes humanos são classificados como braquidontes, por apresentarem porções distintas denominadas de coroa e raiz.

A coroa é revestida pelo esmalte e a raiz pelo cimento. Logo abaixo, tanto na coroa quan-

to na raiz, encontramos a dentina, que é composta em 70% por cristais inorgânicos de hidroxiapatita, 20% de fibras colágenas com pequenas quantidades de outras proteínas e 10% de peso em água. O cimento é constituído em 45 a 50% por minerais (cálcio e fosfato) e o

<sup>1</sup> DDS, MSD, Departamento de Odontologia Restauradora - Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP - Piracicaba - SP.

<sup>2</sup> DDS, MSD, PhD, Departamento de Morfologia, Estomatologia e Fisiologia - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - USP - Ribeirão Preto - SP

<sup>3</sup> DDS, MSD, PhD, Departamento de Morfologia Animal-Faculdade de Medicina Veterinária deJaboticabal -UNESP-Jaboticabal - SP

<sup>4</sup> DDS, Departamento de Morfologia, Estomatologia e Fisiologia-Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - SP-Ribeirão Preto - SP

#### ***Correspondência para / Correspondence to:***

Rua Bernardino de Campos, 30 - apto. 1002 - Higienópolis.  
14015-130. Ribeirão Preto - SP - Brasil.

Tel.: (16) 3964-6910; 8121-8646.

***E-mail:*** lucasgarcia@fop.unicamp.br

restante por material orgânico (colágeno tipo I).<sup>1</sup>

Nas duas porções (coroa e raiz de cada dente) encontramos uma cavidade (pulpar), preenchida por tecido conjuntivo, que varia do tipo mucoso (dente jovem), ao frouxo (dente adulto). Odontoblastos, fibroblasto, macrófagos, linfócitos, células de Schwann, células endoteliais, células indiferenciadas, pericitos, capilares, veias, artérias, fibras colágenas e fibras nervosas mielínicas e amielínicas também fazem parte do tecido pulpar.<sup>1,2</sup>

A constituição tecidual de cada dente tem sido analisada por diversos autores.<sup>1,3,4,5</sup> Os tecidos duros de cada dente (esmalte, dentina e cimento), bem como o tecido pulpar, precisam ser bem preservados, para que o corte histológico seja de qualidade, oferecendo detalhes precisos da anatomia microscópica dentária. A escolha do fixador e do tempo de fixação, a técnica de descalcificação e as soluções usadas com esse objetivo, a inclusão em parafina ou em outro meio como a historresina, a espessura do corte histológico e as colorações utilizadas são fatores importantes na obtenção de uma preparação adequada para as mais diversas análises ao microscópio de luz. Tendo em vista os dados da literatura, foram comparadas duas soluções descalcificadoras, objetivando a escolha da mais eficaz na obtenção de cortes histológicos de qualidade dos dentes permanentes humanos.

### **MATERIAL E MÉTODOS**

Oito dentes humanos permanentes, com autorização prévia dos pacientes envolvidos na pesquisa e aprovação do Comitê de Ética em Pesquisas da FORP (USP), foram extraídos e imediatamente submetidos ao processo de fixação em solução de Formol a 10% por um período de 7 dias. Terminado o processo de fixação, os dentes foram divididos randomicamente em 2 grupos de 4 dentes cada (n=4), e o Grupo I foi submetido ao processo de descalcificação, durante 27 dias, com uma solução de Ácido Nítrico à 4%. Para o Grupo II, o processo de descalcificação durou 42 dias, utilizando-se uma

solução de Citrato de Sódio à 20% + Ácido Fórmico à 30%, em partes iguais.

O tempo de fixação para cada grupo foi determinado, mediante a aferição da consistência do tecido dental, com o auxílio de uma agulha. Essa análise foi realizada a cada 2 dias, período na qual se fazia a troca das soluções fixadoras.

Terminado o processo de descalcificação, os dentes foram submetidos ao processamento histológico de rotina: desidratatação, diafanização, inclusão em parafina, microtomia de cortes semi-seriados com 5 micrômetros de espessura e coloração segundo as técnicas da Hematoxilina-Eosina e do Tricrômico de Gomori.

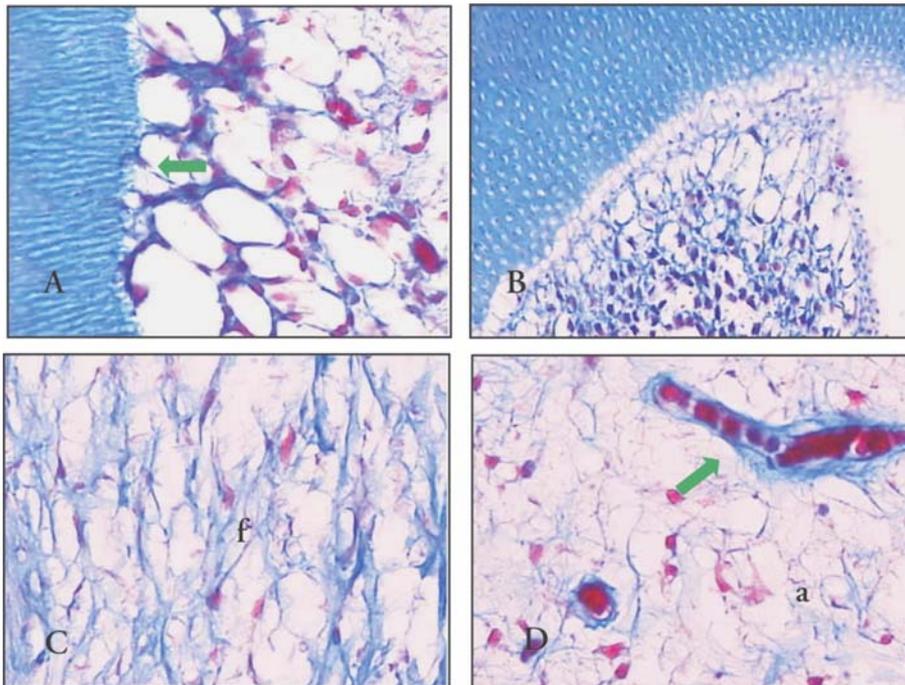
Obtidos os cortes histológicos, eles foram analisados através da microscopia de luz, com aumento de 40X, considerando o aspecto microscópico de seus tecidos e componentes característicos. Após a seleção dos cortes, eles foram fotografados no fotomicroscópio, determinando-se a solução que foi capaz de descalcificar os tecidos dentais sem causar maiores danos às estruturas submetidas à análise.

### **RESULTADOS**

A solução de Ácido Nítrico a 4% (Grupo I) foi bastante agressiva tanto para o esmalte, quanto para o cimento (FIGURA 1).

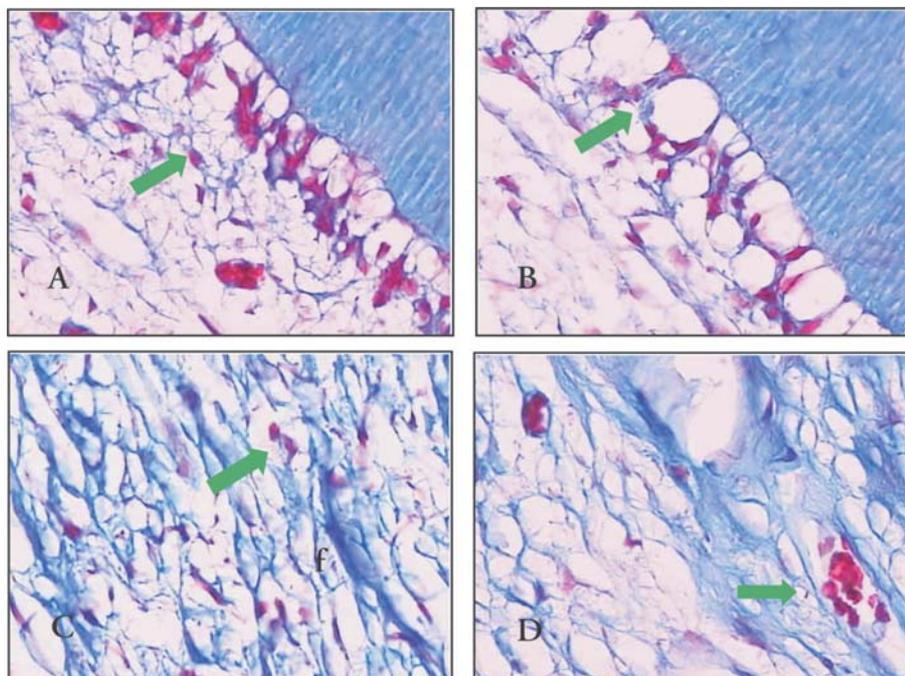
Os melhores resultados foram conseguidos com a solução descalcificadora utilizada no Grupo II (Citrato de Sódio a 20% + Ácido Fórmico a 30%, em partes iguais). Apesar do processo de descalcificação neste grupo ter durado 42 dias, esta solução promoveu danos menores às estruturas analisadas. O tecido pulpar no Grupo II foi preservado de maneira satisfatória, evidenciando todos os seus elementos constituintes (FIGURA 2).

As duas soluções descalcificadoras não tiveram diferença significativa no desempenho quanto à descalcificação da dentina, permitindo um aspecto microscópico semelhante nos dois grupos experimentais.



**Figura 1 - Fotomicrografia dos tecidos dentais do Grupo I.**

Notas: A - Odontoblastos, com prolongamentos adentrando túbulos dentinários (seta); B - Remanescente pulpar, com visão ampla dos odontoblastos e seus prolongamentos; C- Tecido pulpar remanescente, mostrando a presença de fibras colágenas (f); D - Tecido pulpar, evidenciando o tecido conjuntivo frouxo (a). Vasos sanguíneos no interior do mesmo, indicados pela seta. Objetiva de 40 x; Tricrômico de Gomori.



**Figura 2 - Fotomicrografia dos tecidos dentais do Grupo II.**

Notas: A - Odontoblastos, com prolongamentos adentrando túbulos dentinários (seta); B - Idem A; C - Tecido pulpar remanescente, com muitas fibras colágenas (f); D - Tecido pulpar remanescente, mostrando vasos sanguíneos (seta). Objetiva de 40x. Tricrômico de Gomori.

## DISCUSSÃO

Considerando a anatomia macro e microscópica dos vários tipos de dentes, a composição bioquímica de seus tecidos e a avaliação da eficácia de um determinado tratamento endodôntico, necessária se faz a utilização de uma técnica que forneça detalhes histológicos dos diversos dentes.

Em cada técnica histológica, as especificações referentes às suas etapas constituintes (fixação, descalcificação, desidratação, diafanização, inclusão em parafina, desparafinização, hidratação, coloração, desidratação, diafanização e montagem da lamínula) devem ser rigorosamente obedecidas.<sup>6,7</sup>

A fixação constitui uma das etapas mais importantes dos processamentos histológicos, pois depende de mecanismos físico-químicos nos quais os componentes macromoleculares dos tecidos e das células passam por um processo de solubilização, causando sua estabilização e inativação. Em última análise, o processo de fixação biológica promove uma preservação das características morfológicas e macromoleculares dos tecidos ou células. A fixação também tem por função impedir a autólise ou degradação bacteriana do material biológico a ser analisado ao microscópio.<sup>5</sup>

Atribui-se também aos agentes fixadores a função de facilitar os processamentos posteriores de coloração, pois muitos corantes apresentam maior afinidade com o substrato fixado, além de promoverem um enrijecimento dos tecidos.<sup>7</sup>

Uma análise satisfatória de um preparado histológico depende primordialmente da preservação adequada do que se pretende analisar. Assim, numa fixação insatisfatória, muitas vezes, estruturas tissulares que seriam vistas por meio de uma fixação adequada parecem obscuras. Existem muito compostos químicos que podem ser utilizados como substâncias fixadoras. Dentre elas, encontram-se os aldeídos (formaldeído, glutaraldeído e paraformaldeído), que são excelentes fixadores de proteínas, pois promovem uma ligação cruzada entre as cadei-

as polipeptídicas; o tetróxido de ósmio (eficiente na fixação de lipídios e muito utilizado, juntamente com o glutaraldeído, em fixações para microscopia eletrônica); o ácido pícrico, o ácido crômico e o bicloreto de mercúrio, que são ótimos fixadores de proteínas.<sup>8</sup>

Na obtenção de cortes histológicos de tecidos calcificados, como aqueles dos dentes, diversas soluções descalcificadoras têm sido utilizadas, como a do ácido nítrico a 5%, a do ácido clorídrico a 5%, de EDTA a 10% contendo glutaraldeído em pH 7,4<sup>9</sup> e de citrato de sódio a 20%, mais ácido fórmico a 30%, em partes iguais.<sup>10</sup>

Da mesma forma que ocorre na fixação, a descalcificação de tecidos mineralizados é um passo de suma importância para a obtenção de cortes histológicos adequados para análise.

Neste trabalho, foi realizada uma análise comparativa entre duas das soluções descalcificadoras mais utilizadas no processamento histológico de tecidos mineralizados. Os resultados obtidos mostraram que ambas são capazes de preservar satisfatoriamente os tecidos dentais.<sup>11</sup> A solução utilizada no Grupo II necessitou de um período de tempo maior (42 dias), em comparação a do Grupo I (27 dias), para promover uma descalcificação adequada dos tecidos, permitindo o seu corte. Em contrapartida, tal solução foi capaz de preservar de forma mais adequada os constituintes celulares do tecido pulpar remanescente, facilitando sua posterior análise microscópica.

## CONCLUSÕES

De acordo com a metodologia aplicada, pôde-se concluir que, apesar de ambas as técnicas apresentarem resultados satisfatórios, a técnica histológica que utilizou a solução descalcificadora constituída pelo Citrato de Sódio a 20% + Ácido Fórmico a 30% (Grupo II) superou a outra técnica, quanto à qualidade dos cortes histológicos.

## ***Histological technique suitable to microscopic analysis of tissues of permanent teeth***

### ***Abstract***

***The choice of the fixative, the time of fixation, the decalcification technique and the solutions used are important factors in order to obtain a preparation appropriate for diverse light microscopy analyses. The objective of the present study was to identify the most adequate histological technique for recently extracted permanent teeth by varying the decalcification solutions. For this purpose, 8 third molars were fixed in 10% formalin for 7 days and then decalcified. Four of these teeth were decalcified in 4% nitric acid solution (Group I), for 27 days. The other four teeth were decalcified in a solution containing equal parts of 20% sodium citrate and 30% formic acid (Group II), for 42 days. The specimens were embedded in paraffin in the horizontal position, cut into 5 micrometers thick sections with a microtome, and stained with hematoxylin-eosin and Gomori's trichrome. The histological sections obtained were analyzed microscopically, selected and photomicrographed. The histological technique using 20% sodium citrate and 30% formic acid as decalcification solution provided the best results, preserving in a more satisfactory manner the crown-root tissues of the permanent teeth analyzed.***

***Keywords: Dental tissues, decalcification solutions, histological technique***

### ***REFERÊNCIAS***

- 1 JUNQUEIRA, L.C.U.; CARNEIRO, J. ***Histologia básica***. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.
- 2 AVERY, J.K. ***Fundamentos de histologia e embriologia bucal: uma abordagem clínica***. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.
- 3 GATNER, L.P.; HIATT, J.L. ***Tratado de histologia***. 2.ed. Rio de Janeiro: GuanabaraKoogan, 2003.
- 4 ROSS, M.H.; ROMRELL, L.J. ***Histologia: texto e atlas***. 2.ed. São Paulo: Panamericana, 1993.
- 5 MJÖR, I.A.; FEJERSKOV, O. ***Embriologia e histologia oral humana***. São Paulo: Panamericana, 1990.
- 6 TOLOSA, E.M.C. et al. ***Manual de técnicas para histologia: normal e patológica***. 2.ed. São Paulo: Manole, 2003.
- 7 TOCK, E.P.; PEARSE, A.G. Preservation of tissue mucins by freeze-drying and vapour fixation. I. Light microscopy. ***J. R. Microsc. Soc.***, London, v.85, n.4, p.519-537, 1965.
- 8 TABOGA, S.R. Métodos de estudo da célula. 1. Preparações citológicas. In: CARVALHO, H.F.; RECCO-PIMENTEL, S.M. ***A célula***. São Paulo: Manole, 2001.
- 9 BAIRD, I.L.; WINBORN, W.B.; BOCKMAN, D.E. A technique of decalcification suited to electron microscopy of tissues closely associated with bone. ***Anat. Rec.***, New York, v.159, n.3, p.281-289, 1967.
- 10 MORSE, A. Formic acid: sodium citrate decalcification and butyl alcohol dehydration of teeth and bone for sectioning in paraffin. ***J. Dent. Res.***, Alexandria, v.24, p.143-153, 1945.
- 11 LUNA, L.G. ***Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology***. New York: McGraw Hill, 1968.

Recebido em / ***Received***: 07/11/2007  
 Aceito em / ***Accepted***: 20/12/2007