

* Camillo D'Arcangelo
** Antonio Tucci
*** Tonino Traini
*** Sergio Caputi
** Vito Antonio Malagnino

Università degli Studi
"G. D'Annunzio" Chieti
Dipartimento di Discipline
Odontostomatologiche
Direttore: Prof. Sergio Caputi
*Cattedra di Odontoiatria Restaurativa
Titolare: Dott. Camillo D'Arcangelo
**Cattedra di Endodonzia
Titolare: Prof. Vito Antonio Malagnino
***Cattedra di Protesi
Titolare: Prof. Sergio Caputi

Corrispondenza:
Dott. Camillo D'Arcangelo
Via Baroncini, 16
66100 Chieti
E-mail: cdarcang@unich.it

Analisi della microanatomia e della risposta infiammatoria in polpe di elementi dentari affetti da patologia cariosa

Microanatomy and inflammatory response in dental pulps of teeth affected by dental caries

RIASSUNTO

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di osservare la microanatomia e l'infiltrato infiammatorio in polpe dentarie di denti cariati.

Per lo studio sono stati selezionati 18 molari permanenti. Ciascun campione presentava un processo carioso con interessamento di smalto e dentina, distante dalla polpa almeno 1 mm.

Dopo l'estrazione i campioni sono stati preparati per l'osservazione al microscopio ottico (MO) ed al microscopio elettronico a scansione (MES).

Nella aree appena al di sotto della lesione cariosa l'osservazione al MO ha mostrato cellule dell'infiammazione cronica in cui predominano venule post-capillari ectasiche. Questo aspetto è sovrapponibile a quello ritrovato nelle porzioni più interne della polpa. Nella porzione apicale i vasi appaiono regolari con assenza totale di infiltrato infiammatorio.

L'osservazione al MES conferma l'aspetto riscontrato dalla microscopia ottica. Da notare la presenza di numerosi linfociti in differenti stadi di attivazione.

Le nostre osservazioni confermano come le lesioni cariose inducano una risposta cronica infiammatoria. Tuttavia non appare alcun segno di infiammazione a livello apicale anche quando si ha la necrosi.

Parole chiave:

Carie, infiammazione pulpare.

ABSTRACT

The aim of this work was to observe the microanatomy and the inflammatory infiltrate and bloody cells of dental pulps with moderate and severe grade of inflammation

evoked by carious lesions.

For the study 18 decayed third molars were selected. Each sample showed dentinal deep carious lesions with a distance from the pulp chamber greater than 1 mm.

After the extraction, the specimens were randomly divided in two groups and processed for examination with light microscopy and SEM.

In the areas beneath the carious lesions light microscopy showed cells of chronic inflammation and ectasic post capillary venules. This aspect is not different in middle portion of the pulp. In apical portion the vessels appear regular with absence of sign of inflammation.

SEM observation confirms the light microscopy aspect. It is remarkable the presence of lymphocytes, in different stages of activation.

Our observations confirm that carious lesion induce a chronic response. But it is not usual to observe absence of inflammation in the apical portion also when necrosis occurs.

Key words:

Carious lesions, pulpal inflammation.

INTRODUZIONE

Le cause principali di infezioni pulpari sono la carie dentaria e le fratture dentarie.

I batteri diffondono dalla lesione cariosa o dalla zona esposta dal trauma alla polpa, inducendo una risposta infiammatoria. Con la penetrazione batterica all'interno della dentina gli odontoblasti sottostanti risultano colpiti. Infatti, essi inizialmente sono stimolati a produrre collagene con un aumento della attività enzimatica metabolica. Successivamente il numero degli odontoblasti si riduce e morfologicamente si trasformano da alte cellule colonnari in piatte cellule cuboidali. Con l'approfondirsi della lesione cariosa gli odontoblasti primari

muoiono (1). Gli odontoblasti degenerati sono rimpiazzati da cellule derivate da fibroblasti pulpari, che migrano dalla zona ricca di cellule e si differenziano in nuovi odontoblasti. Gli antigeni batterici diffondono attraverso i tubuli dentinali e nella polpa inducono una risposta immunitaria.

Le reazioni pulpari alla patologia cariosa sono:

- diminuzione della permeabilità dentinale (sclerosi dentinale);

- formazione di nuova dentina;

- reazioni infiammatorie e immunologiche.

La risposta pulpare può variare a seconda della rapidità della progressione del processo oppure non aversi affatto. La carie tende ad essere un processo intermittente, con periodi di attività rapida alternati a periodi di quiescenza. L'infiammazione pulpare inizia come un processo cronico molto lento (2). La risposta cronica è indotta dall'attivazione del sistema immunitario da parte degli antigeni batterici che raggiungono la polpa attraverso la lesione cariosa. La reazione immunitaria inizia dopo la cattura ed il processamento degli antigeni da parte delle AP cells e il loro trasporto alle stazioni linfonodali. Con l'approfondirsi della lesione cariosa nella porzione dentinale l'infiammazione cronica evolve in una fase acuta. La risposta vascolare in tal senso è coinvolta direttamente nel sistema di richiamo cellulare tipico dell'infiammazione, appunto permettendo il richiamo di cellule infiammatorie (3). Un ruolo fondamentale nell'induzione dell'infiammazione è svolto da alcuni neuropeptidi liberati, in risposta alla trasmissione di alcuni segnali antidromici rivolti al SNC, da fibre amieliniche di tipo C, come CGRP (*calcitonine gene related peptide*) e la sostanza P sensibili alla capsaicina (4). Questi peptidi agiscono direttamente sulle pareti delle arteriole e delle venule, causando vasodilatazione, mentre indirettamente agiscono stimolando il rilascio di istamina ed eicosanoidi da parte dei mastociti. Inoltre, essi aumentano l'adesione e la chemiotassi dei neutrofili coinvolti nella risposta

sta infiammatoria e agiscono anche sui fibroblasti e l'endotelio vascolare. Dopo l'inizio della risposta da parte della polpa dentaria, ha luogo una crescita di fibre amieliniche indotte dal NGF (fattore di crescita di fibre nervose) liberato dai fibroblasti della polpa e che ha come bersaglio recettori localizzati su membrane assoplasmatiche di fibre nervose amieliniche o di cellule di Schwann ad esse associate (5).

La necrosi pulpare si ha quando le difese dell'ospite non riescono ad eliminare gli irritanti, conducendo ad una necrosi colliquativa dovuta alla risposta ad organismi pirogenici.

La polpa manca di una circolazione collaterale per cui è totalmente dipendente, per l'apporto di ossigeno, dai vasi arteriosi che entrano nel forame apicale. Quando fluidi edematosi si accumulano nei tessuti molli, la trasudazione dovrebbe compensare l'aumento dei fluidi extravasali. Secondo la "teoria strangolatoria", all'interno della camera pulpare lo spazio per compensare l'accumulo di liquidi è ottenuto a spese delle venule la cui pressione interna è minore di quella arteriolare (6). Ciò determinerebbe un aumento delle resistenze vascolari venose con congestione passiva, ipossia e necrosi pulpare di tipo ischemico (7).

Scopo di questo studio è stata l'osservazione al microscopio ottico ed elettronico a scansione della microanatomia e dell'infiltrato infiammatorio in polpe dentarie con moderato e severo grado di infiammazione indotto dalla presenza di lesioni cariose.

MATERIALI E METODI

Per questo studio 18 ottavi destinati alla avulsione, di cui 10 inferiori e 8 superiori, sono stati selezionati. Caratteristica comune di questi elementi era la presenza di lesioni cariose interessanti la compagine dentinale che clinicamente appariva essere ad una distanza dalla camera pulpare di almeno 1 mm. Ciascun elemento apparteneva a individui di età compresa tra i 25 e 35 anni. Prima dell'estrazione degli elementi dentari, clinicamente nessun paziente lamentava alcuna sintomatologia di tipo pulpittico, se non dolore transitorio indotto da stimolazione termica. Dopo l'estrazione ciascun elemento è stato immediatamente sezionato per frattura secondo il proprio asse longitudinale. Le polpe così ottenute sono

state suddivise in modo casuale in due gruppi, per essere preparate per l'osservazione con microscopia ottica (MO) o elettronica a scansione (MES).

Nel primo gruppo, preparato per l'osservazione al microscopio ottico, tutte le polpe ottenute sono state immediatamente conservate in una soluzione di formaldeide al 10%. Dopo essere state accuratamente risciacquate, sono state disidratate, impiegando una scala alcolica crescente, e immerse in resina acrilica (Technovit 7200 VCL, Kulzer, Wehrheim, Germania) che è stata polimerizzata. Ciascun campione successivamente è stato tagliato orizzontalmente con un disco diamantato ad alta precisione fino ad ottenere delle sezioni di circa 70 µm. Mediante l'impiego del sistema Exakt (*cutting grinding system*, Amburgo, Germania), le sezioni sono state ridotte a circa 30 µm per abrasione. Esse sono state così colorate con blu di toluidina, fucsina acida e una colorazione policromatica all'argento ed esaminate a differenti ingrandimenti nelle porzioni apicali, centrali ed immediatamente al di sotto delle lesioni cariose.

Il secondo gruppo di campioni è stato sottoposto ad un processo di pretrattamento consistente nella conservazione in una soluzione al 2% di glutaraldeide in tampone fosfato 0.05 M, pH 7.4 366 mOsm, a 4°C per 20 ore. Successivamente i campioni sono stati lavati in una soluzione tampone fosfato 0.1 M con 0.15 M di saccarosio per assicurare un valore costante di 360 mOsm. Dopo la prefissazione i campioni sono stati trattati con il metodo OTO modificato di Seligmann (8) con ripetute esposizioni al tetrossido di osmio ed al tiocarboidrazide. Tutti i campioni sono stati metallizzati (Emitech K 550 Emitech Ltd., Ashford, Kent, UK) e successivamente esaminati e fotografati al MES a differenti ingrandimenti (Leo 435 Vp Cambridge, UK) operando a 15-20 kV.

RISULTATI

L'osservazione al microscopio ottico, eseguita a livello della porzione pulpare sottostante la lesione cariosa, evidenzia che tutti i campioni presentano un quadro di infiammazione moderata. Tipico è l'aspetto delle venule post-capillari che appaiono ectasiche. Pochi leucociti aderiscono alla parete endoteliale, mentre appare significativa la stasi cellulare in cui predominano ema-

zie tra loro agglomerate, occupanti una posizione centrale nel lume vasale (Figg. 1 e 2). Nelle zone immediatamente prossime al vaso è possibile notare una numerosa popolazione cellulare.

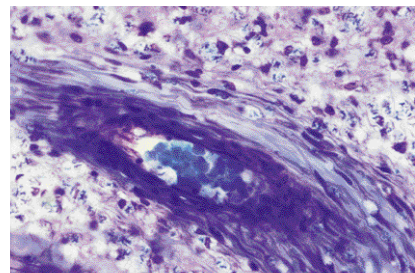


Fig. 1 - MO (500x). Zona pulpare al di sotto della carie dentaria. Alla colorazione con blu di toluidina e fucsina acida risultano evidenti segni di infiammazione ed accumulo cellulare perivasale.

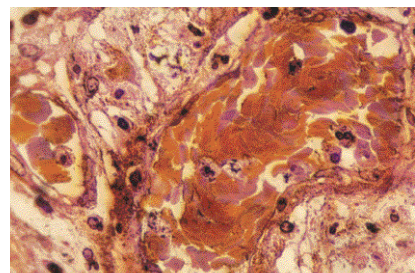


Fig. 2 - MO (500x). Zona pulpare al di sotto della carie dentaria. Anche la colorazione policromatica all'argento evidenzia segni di stasi cellulare intra e perivasale in venule postcapillari.

L'aspetto non appare essere molto differente nelle porzioni più centrali della polpa (Fig. 3). Qui è possibile apprezzare la mancanza di una stagnazione vasale, mentre sono presenti numerosi leucociti polimorfonucleati (PMN), taluni dei quali aderiscono direttamente alla superficie endoteliale. Nei tessuti circostanti appaiono evidenti cellule appartenenti al siste-

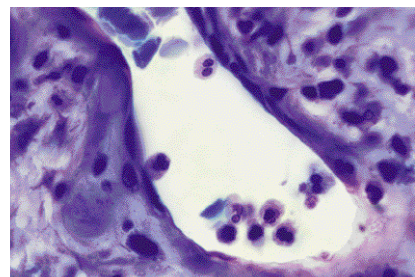


Fig. 3 - MO (800x). Porzione centrale della polpa dentaria. In questa porzione sono presenti segni di accumulo cellulare perivasale mentre non è apprezzabile stagnazione cellulare intravasale. Colorazione con blu di toluidina.

ma immunitario (linfociti, plasmacellule, macrofagi). Solo in due casi sono visibili alcune aree di necrosi colliquativa (Figg. 4 e 5). Nella zona immediatamente al di sotto dell'area necrotica è possibile evidenziare chiaramente un'elevata presenza di leucociti con una grande predominanza di polimorfonucleati. Si è potuto constatare come la lesione cariosa raggiungesse quasi lo strato odontoblastico ad una distanza di circa 0.5 mm dalla polpa e non di circa 1 mm come l'esame radiografico aveva suggerito, inducendo una risposta infiammatoria acuta con vasodilatazione e accumulo di neutrofili.

L'osservazione della zona apicale non mostra alcuna alterazione istologica e cellulare. In questa porzione i tessuti appaiono sani, senza vasi ectasici e cellule infiammatorie. Lo strato odontoblastico sembra essere normale con cellule a palizzata, di normale densità e forma, e massiva proliferazione di cellule indifferenziate (Fig. 6). I vasi in questa zona appaiono pervi, senza accumulo e stasi cellulare. Anche nei tessuti perivasali non si distingue predominanza cellulare di tipo infiammatorio (Fig. 7).

L'osservazione al microscopio elettronico a scansione risulta confermare queste osservazioni. A livello apicale infatti, lontano dalla porzione prospiciente la zona cariosa, i vasi ar-

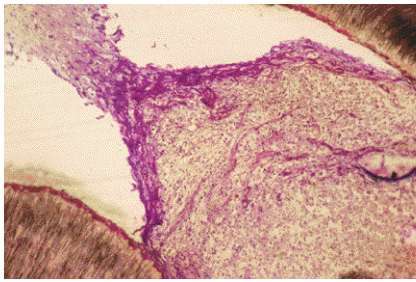


Fig. 4 - MO (50x). Zona di necrosi al di sotto della porzione cariosa. Colorazione con blu di toluidina e fucsina acida.

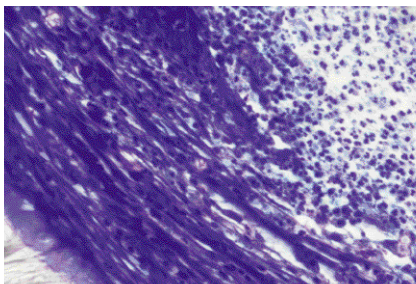


Fig. 5 - MO (250x). Particolare della foto precedente. La necrosi al di sotto della porzione cariosa appare essere di natura colliquativa.

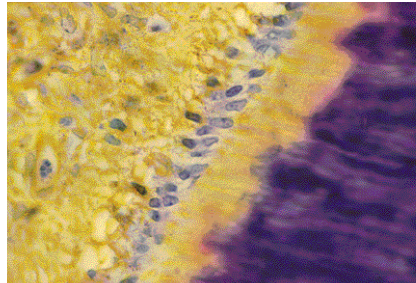


Fig. 6 - MO (400 x). Zona pulpale a livello apicale in cui mancano evidenti segni di infiammazione. Lo strato odontoblastico appare perfettamente integro con regolare distribuzione cellulare. Colorazione policromatica all'argento.

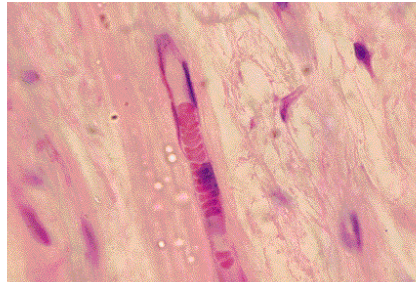


Fig. 7 - MO (1250 x). Aspetto vasale a livello apicale. Sono assenti accumuli cellulari intra e perivasali con vasi non ectasici. Colorazione con blu di toluidina e fucsina acida.

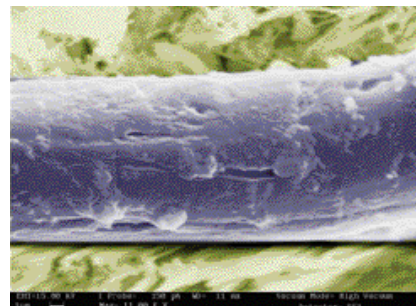


Fig. 8 - MES (11 Kx). Osservazione vasale a livello apicale che appare normale. È visibile il nucleo dell'epitelio della parete vasale.

teriali appaiono essere regolari. Nella Figura 8 appare evidente la presenza del nucleo dell'epitelio del vaso, aspetto simile riscontrato anche in microscopia ottica (Fig.9). Al MES, in modalità *back scattered* (elettroni retrodiffusi), il perfetto stato di salute pulpale a livello apicale è confermato. E' possibile evidenziare un'arteriola perfettamente pervia (Figg. 10 e 11), associata a fibra nervosa ed assenza di infiltrato infiammatorio cellulare perivasale. Nelle porzioni al di sotto della zona cariata, il grado di infiammazione è sottoli-

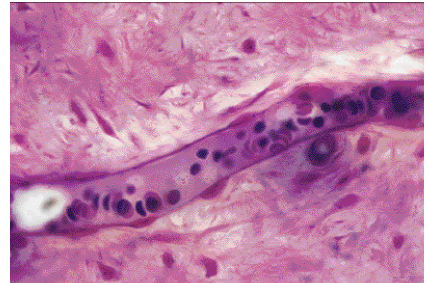


Fig. 9 - MO (500x). Osservazione vasale a livello apicale. Aspetto di un vaso senza segni di infiammazione; da notare l'epitelio con il suo nucleo, immagine sovrapponibile alla precedente. Colorazione con blu di toluidina e fucsina acida.

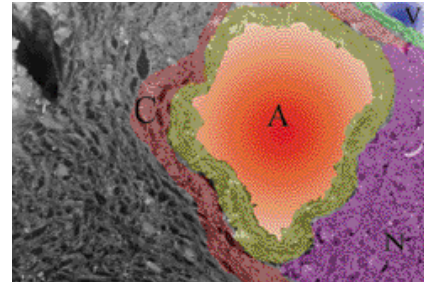


Fig. 10 - MES (344x). L'osservazione vasale a livello apicale in modalità *back scattered* ci indica il regolare rapporto tra nervo, arteriola e vena e segni di stasi senza stagnazione.

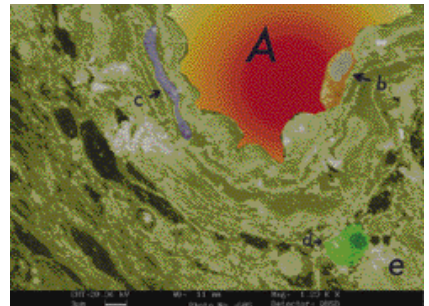


Fig. 11 - MES (1.23Kx). Particolare della immagine precedente a livello apicale.

neato dalla presenza di un grosso accumulo cellulare. Molto evidenti sono eritrociti e leucociti (Fig. 12). Dalla morfologia di superficie e dalle dimensioni cellulari essi sono riconducibili a popolazioni linfocitarie. Essi appaiono da un punto di vista morfologico estremamente variabili, con numerosissime protuberanze citoplasmatiche, di solito riconducibili a differenti stadi di attivazione e secrezione. Tutti questi elementi cellulari sono immersi in una fitta rete di fibre reticolari perivasali (Figg.13 e 15).

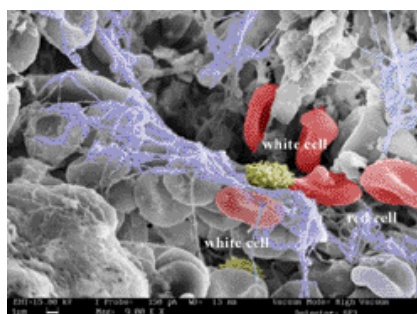


Fig. 12 - MES (9 Kx). Zona al di sotto della carie. Sono presenti grosse quantità di elementi cellulari perivasali, in cui predominano eritrociti.

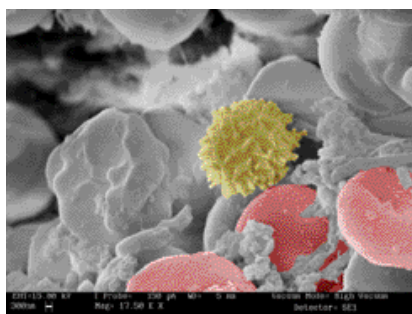


Fig. 15 - MES (17.5 Kx). Zona al di sotto della carie. Aspetto tipico di linfocita abbondantemente presente in prossimità della lesione cariosa.

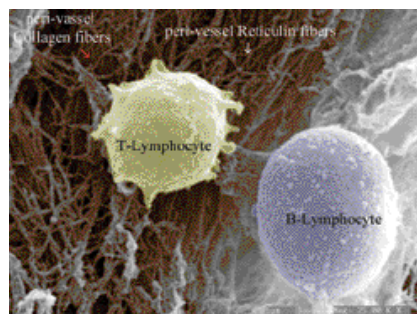


Fig. 13 - MES (25 Kx). Zona al di sotto della carie. Le caratteristiche morfologiche e dimensionali di questi elementi cellulari sono riconducibili a quelle linfocitarie.

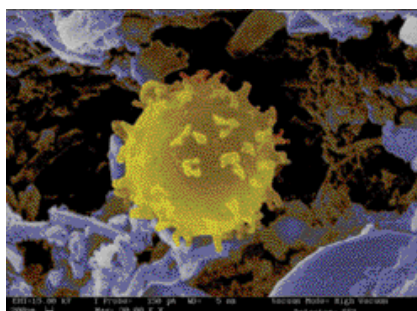


Fig. 14 - MES (30 Kx). Zona al di sotto della carie. Le tipiche propaggini ci fanno ricondurre questi linfociti a Lym-T in fase di attivazione citoplasmatica.

DISCUSSIONE

Le nostre osservazioni hanno evidenziato che le lesioni cariose inducono realmente una risposta pulpale di tipo cronico. Infatti, benché non sia netta la separazione istologica tra infiammazione cronica ed acuta, in tutti i campioni da noi osservati è stato possibile evidenziare nelle zone sottostanti i processi cariosi cellule di questo tipo di infiammazione. Essa coinvolge il sistema immunitario e le risposte immunologiche, dove un ruolo determinante è svolto dai linfociti T CD4⁺, ma anche da fibroblasti, plasmacellule e macrofagi.

Il presupposto essenziale è la conservazione delle zone danneggiate. È, infatti, biologicamente indispensabile che tutti gli elementi che partecipano alla risposta immunitaria e/o riparativa possano raggiungere i siti danneggiati.

La valutazione sullo stato fisiopatologico delle rete vasale pulpale ha evidenziato che nelle porzioni apicali della polpa i vasi sono ben protetti e risultano solo moderatamente ectasici e soprattutto privi di impiccamento cellulare. I meccanismi locali che portano allo sviluppo della risposta im-

munologica coinvolgono le *AP cells* (cellule dendroidiche, macrofagi, Lym B, cellule endoteliali). Esse hanno il compito di presentare l'antigene processato ai Lym T CD4⁺, i quali si attivano e rilasciano citochine che stimolano la trasformazione di Lym B in plasmacellule con produzione di anticorpi specifici.

Numerosi Autori hanno evidenziato come da un punto di vista morfologico è impossibile distinguere la sottopopolazione linfocitaria (9). La presenza di piccoli microvilli su superfici lisce in cellule di dimensioni di circa 5-7 μ m, possono farci pensare ad un Lym B, mentre la presenza di estroflessioni o di proiezioni possono ricondurre a Lym-T attivati (10). Secondo questi Autori la presenza di estroflessioni citoplasmatiche è direttamente proporzionale al grado di attivazione cellulare (11). L'analisi della microanatomia di superficie potrebbe essere utile per quantificare l'eventuale risposta immunitaria pulpale.

CONCLUSIONI

Dalle nostre osservazioni sembra essere confermato come una patologia cariosa possa indurre una infiammazione di tipo cronico in risposta all'insulto da essa arrecato. Tuttavia, la reazione sembra essere confinata unicamente alla zona immediatamente prossima alla carie, almeno in lesioni distanti circa 1 mm dalla strato odontoblastico. In tutte le altre porzioni pulpari, l'assetto vascolare sembra non essere alterato. La risposta immunitaria cronica alla lesione cariosa è sottolineata dall'elevata percentuale di linfociti presenti nei tessuti pulpari sottostanti la carie. Tale reazione infiammatoria è tuttavia localizzata unicamente a livello coronale e totalmente assente a livello apicale.

BIBLIOGRAFIA

1. Cohen S, Burns R. Pathways of the pulp. Simon JHS. *Pathology*. 6th ed, St. Louis: Mosby; 1994:379-401.
2. Trowbridge HO. Pathology of the pulp and periapical tissue. In Hardin JF, ed *Clark's Clinical Dentistry*. Vol.5, Philadelphia: Lippincott (in press).
3. Trowbridge HO, Steven DH. Microbiology and pathologic aspect of pulpal and periapical disease. *Curr Opin Dent* 1992; 2: 85-92.
4. Hargreaves KM, Bowels WR, Garry MG. An in vitro method to evaluated regulation of neuropeptide release from dental pulp. *J Endod* 1992; 18:597-600.
5. Heyeras KJ, Kwinnsland I. Tissue pressure and blood flow in pulpal inflammation. *Proc Finn Dent Soc* 1992; 88 (suppl 1): 394-402.
6. Byers MR. Effects of inflammation on dental sensory nerves and viceversa. *Proc Finn Dent Soc* 1992; 88 (suppl): 459-506.
7. Farber PA. Scanning electron microscopy of cells from periapical lesions. *J Endod* 1975; 1(9):291-4.
8. Seligman AM et al. A new staining method (OTO) for enhancing contrast of lipid-containing membranes and droplets in osmium tetroxide fixed tissue with osmiophilic thiocarbonylhydrazine (TCH). *J Cell Bio* 1966; 30: 424-32.
9. Terzakis JA. Distinguishing B and T lymphocytes by scanning electron microscopy. *Ultrastruct Pathol* 2000; 24(4):205-9.
10. Alexander EL, Wetzel B. Human lymphocytes: similarity of B and T cell surface morphology. *Science* 1975; 188(4189):732-4.
11. Bykovskaya SN, Shevelev AA, Kupriyanova TA. Activation of secretion and surface alteration of cytolytic T-lymphocytes interacting with target cells. *Biomed Pharmacother* 1988; 42(7):461-8.