

3 - Material e Métodos

3.1 População de estudo

Neste estudo foram seleccionados, aleatoriamente um total de 22 indivíduos, provenientes da clínica privada e do Serviço de Estomatologia e Medicina Dentária do Centro Hospitalar do Alto Ave, EPE. (Director: Dr. Fernando Figueira), de raça caucasiana, de ambos os géneros e com área de residência no Norte de Portugal. Dos pacientes seleccionados, 16 eram do género feminino (o que equivale a 72.7%) e 6 eram do género masculino (o que representa uma percentagem de 27.3%). A idade dos pacientes variou entre os 20 e os 56 anos, com uma média de 30,5 anos.

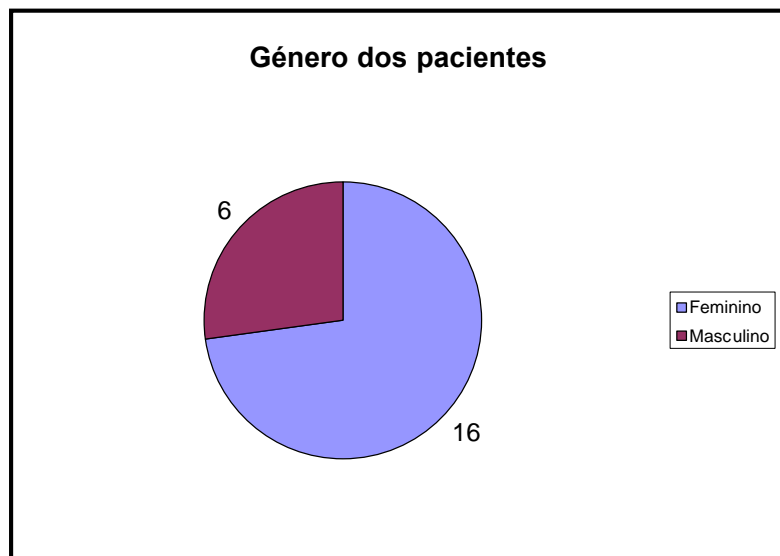


Gráfico 1: Distribuição segundo o género do paciente.

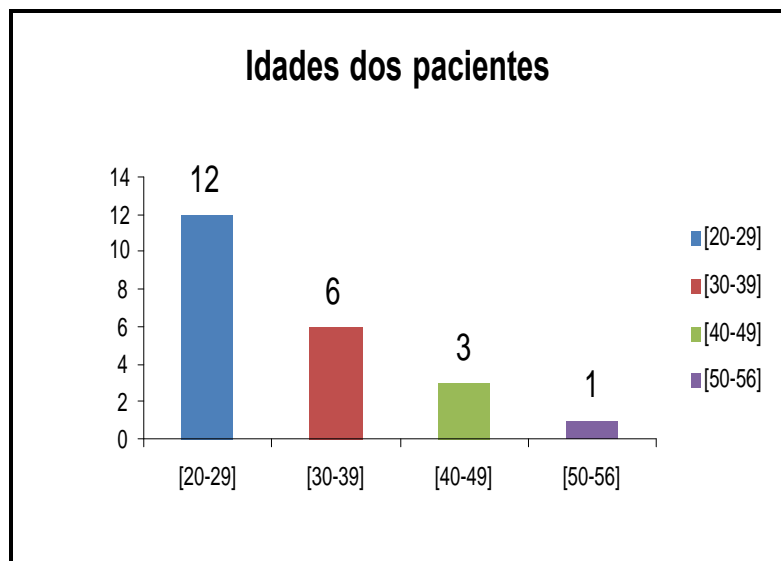


Gráfico 2: Distribuição segundo a idade dos pacientes.

3.2 Metodologia

Foram criados dois grupos de trabalho, de acordo com os protocolos instituídos e em função da terapêutica aplicada. Assim, os indivíduos seleccionados foram medicados de forma distinta e orientados segundo dois protocolos diferentes, adiante descritos:

- **Protocolo I:** os pacientes foram medicados com vitamina C (vitamina C Alter®). Iniciaram medicação 20 dias antes da cirurgia (Grupo A).

- **Protocolo II:** os pacientes não foram medicados com vitamina C (vitamina C Alter®) (Grupo B).

Para dar resposta às questões formuladas nesta investigação, foi elaborado um questionário constituído por questões relevantes para a definição e consequente descrição de possíveis patologias (Anexo 1).

As colheitas das biópsias foram efectuadas no Serviço de Estomatologia e Medicina Dentária do Centro Hospitalar do Alto Ave, EPE. (Director: Dr. Fernando Figueira), com o consentimento informado dos pacientes que constituem a amostra (Anexo 2).

As biópsias foram efectuadas segundo a melhor técnica cirúrgica, em ambiente asséptico, sob anestesia local e sempre pela mesma equipa cirúrgica.

A cada indivíduo foi efectuada uma biópsia a nível da fibromucosa gengival, na face vestibular do dente a extrair. O protocolo adoptado consistiu numa fase inicial de esterilização e assepsia do campo operatório, com o recurso a uma solução de clorexidina a 4% para uso extra-oral e a 0,12% para administração intra-oral. Seguiu-se a anestesia local por técnica infiltrativa. De seguida, foi feita a incisão em dois planos de extensão vertical e horizontal, com bisturi nº 15. Horizontalmente o plano apresentou uma forma elíptica, e verticalmente, uma forma em cunha com convergência. Desta forma, o fragmento excisado apresenta dimensões satisfatórias e suficientes para observação microscópica. Para concluir, foi aplicado um gel de clorexidina e permitida a cicatrização por segunda intenção.

Após a cirurgia dentária, em regime de ambulatório, foi prescrito o Paracetamol 1g (Dafalgan®) e a Amoxicilina 500 mg (Clamoxyl®) como medida terapêutica padrão. Esta medida resume-se à administração sistémica de 1g de Paracetamol de 8 em 8 horas durante 3 dias e de 500 mg de Amoxicilina também de 8 em 8 horas durante 6 dias.

Todos os fragmentos foram colhidos em ambiente de assépsia, fixados em formol tamponado a 10% e enviados ao laboratório de Anatomia Patológica em recipientes fornecidos para o efeito, devidamente etiquetados e acompanhados do respectivo protocolo (Anexo 3). Neste, foram registados o nome, a idade, o género, a direcção, as patologias sistémicas, a terapêutica, os antecedentes pessoais e familiares, o exame intra-oral e extra-oral, a técnica utilizada na realização da biópsia e o dente extraído (Anexo 1).

3.3 Processamento da amostra para microscopia óptica

Os tecidos foram processados segundo os métodos padronizados nos laboratórios de histopatologia, através da fixação, desidratação, diafenização, impregnação e inclusão.

O processamento dos fragmentos tecidulares foi realizado num aparelho denominado processador automático de tecidos. As cassetes que suportam os fragmentos seleccionados foram colocadas num cesto metálico para um bom acondicionamento das mesmas e de forma a permitir um bom contacto das diferentes soluções com as superfícies dos tecidos. Após este procedimento foi iniciado o processamento, seleccionando o programa adequado no módulo do processador por forma a contemplar as quatro fases fundamentais: fixação, desidratação, diafenização e impregnação.

Para proceder à visualização dos cortes histológicos em estudo, foram utilizadas diferentes técnicas de coloração histológica. Assim, foram usadas soluções, ou misturas de soluções, cujo objectivo final foi a diferenciação das principais estruturas celulares presentes. As colorações usadas foram o Tricrómio de Masson, a Hematoxilina-eosina e Van Gieson. Foram ainda aplicadas técnicas de Imunohistoquímica para a determinação de alfa-actina, vimentina e desmina. Todos os cortes foram validados com controlo de qualidade, a partir de testes de positividade.

Posteriormente procedeu-se às observações por microscopia óptica dos tecidos processados com diferentes ampliações, nomeadamente, de x100, x200 e x400, em microscópio Zeiss A1®, e através de microscopia electrónica em microscópio electrónico Jeol CX II.

3.4 Processamento da amostra para microscopia electrónica

A partir das amostras incluídas em blocos de parafina, efectuou-se uma selecção da área de maior interesse, a qual foi removida, cuidadosamente, com ajuda de um bisturi. O fragmento foi cortado em pequenos pedaços e colocado em xilol durante 24 horas de modo a remover toda a parafina. Seguiu-se uma hidratação numa série decrescente de álcool com passagens de 1 hora em etanol a 100% e de 30 minutos em etanol a 90% e 70%, sempre com duas mudanças para cada álcool. De seguida, os fragmentos foram mergulhados em tampão cacodilato de sódio a 0,1 M (pH 7,4) durante 1 hora e 30 minutos, fazendo mudanças do tampão a cada 30 minutos. Seguiu-se a etapa de pós-

fixação durante 1 hora (a 4°C) com tetróxido de ósmio a 1%, em tampão cacodilato de sódio a 0,1 M (pH 7,4). Posteriormente, efectuou-se uma desidratação numa série ascendente de álcool, com passagens de 10 minutos por soluções de etanol a 50%, 75%, 90% e 95%, sempre à temperatura de 4°C, seguidas de três passagens, também de 10 minutos cada, em etanol absoluto. Na última mudança de etanol absoluto o processamento passou a ser à temperatura ambiente. Seguiram-se mais duas passagens, de 10 minutos cada, mas agora por óxido de propileno. A impregnação das amostras na resina de inclusão consistiu em submeter os fragmentos em misturas de óxido de propileno e uma resina tipo Epoxy (*Epon*) nas proporções de 3:1, 1:1 e 1:3, respectivamente, com a duração de 1 hora em cada mistura. Finalmente os fragmentos foram mergulhados em *Epon* puro, no qual ficaram durante 1 hora à temperatura ambiente e durante 30 minutos a 50°C. Seguiu-se a inclusão, realizada em moldes de borracha os quais, depois de preenchidos com um fragmento em cada extremidade e cheios com *Epon*, foram colocados na estufa à temperatura de 60°C durante 2 dias para polimerização da resina. Os cortes ultrafinos foram obtidos com uma faca de diamante, num ultramicrótomo (Leica Ultracut R), e recolhidos em grelhas de cobre com 200 *mesh*. Uma dupla contrastação dos cortes foi efectuada manualmente, tendo-se emergido, primeiramente, as grelhas com os cortes numa solução salinada de acetato de uranilo durante 20 minutos e posteriormente, numa solução de citrato de chumbo durante 10 minutos (Reynolds, 1963). A observação foi feita num microscópio electrónico de transmissão JEOL 100CXII, no qual foram efectuados registos de algumas imagens sob a forma de microfotografias.

3.5 Processamento dos tecidos em histoquímica

3.5.1 Coloração de Hematoxilina – Eosina

A coloração de Hematoxilina-Eosina foi usada em todos os tecidos estudados como primeira coloração. É o principal método histoquímico efectuado na rotina

histopatológica, acompanhando sempre técnicas complementares de diagnóstico como a imuno-histoquímica. É utilizada por ser aquela que nos oferece uma relação núcleo-citoplasma mais fidedigna e por ser a que melhor demonstra a arquitetura tecidual, sendo uma técnica capaz de demonstrar os principais elementos tecidulares: o núcleo, o citoplasma e o colagénio.

Princípio:

Esta técnica tem por base a conjugação de dois corantes com propriedades químicas diferentes, agem sucessivamente um corante nuclear básico (hemateína) e um corante citoplasmático ácido (eosina).

A Hematoxilina é um corante aquoso e de carácter básico, com afinidade para estruturas basófilas como o núcleo. A eosina é um corante aquoso de carácter ácido, com afinidade para estruturas acidófilas como o citoplasma

Nesta coloração os núcleos coram de azul-escuro/ preto, o citoplasma e fibras conjuntivas de rosa / vermelho

Procedimento técnico:

Os tecidos foram preparados tendo por base o protocolo aferido pelo laboratório de Anatomia Patológica e seguiu os passos que a seguir se descrevem:

Os tecidos foram submetidos a três banhos sucessivos em xilol, estando precisamente 10 minutos em cada banho. Em seguida, os tecidos foram hidratados passando para tal por uma série decrescente de álcoois, respectivamente a 100%, 95%, 80%, 50% e finalmente colocados em água.

Depois de lavados, foram corados pela hematoxilina durante 3 minutos, e novamente lavados em água para serem de seguida colocados no Ácido Clorídrico para diferenciação. Seguidamente foram lavados em água corrente durante 10 minutos e posteriormente corados pela eosina durante 3 minutos. Depois de corados pela eosina, os cortes foram lavados, removidos os excessos de corante e depois secos em estufa durante 10 minutos.

Depois de secos os cortes, procedeu-se à montagem em meio resinoso (Entellan®).

3.5.2 Tricrómio de Masson Especial

Esta coloração especial foi particularmente importante na identificação das fibras de colagénio e sua localização, para a compreensão de processos patológicos associados aos miofibroblastos, como a expressão do tecido conjuntivo no processo de reparação, e padronização das alterações histológicas em resposta a agressões físicas ou químicas.

Princípio:

A coloração foi efectuada inicialmente com um corante ácido, a solução de Ponceau-Fucsina ou Fucsina Ácida, a qual corou todas as estruturas acidófilas (citoplasma, músculo, colagénio).

O corante foi retirado das fibras de colagénio por diferenciação com ácido fosfomolibdico, permanecendo ligado ao citoplasma e músculo.

O ácido fosfomolibdico actua também como mordente para o azul de anilina.

Para a coloração nuclear, foi utilizado o azul-celeste, seguido de uma hematoxilina de hemalúmen, pois desta forma obtivemos uma forte coloração nuclear, que é resistente à acção do ácido utilizado.

Procedimento:

Foi feita inicialmente uma desparafinação a que se seguiu a hidratação e lavagem. Os tecidos foram passados por água destilada e corados com azul-celeste durante 5 minutos.

De seguida, os cortes foram escorridos e corados os núcleos com Hematoxilina de Gill durante 5 minutos. Cobriram-se com álcool-pícrico durante 5 minutos e depois foram abundantemente lavados com água corrente.

Depois de bem lavados, foram corados durante 5 minutos pela solução Ponceau-Fucsina. Lavaram-se de seguida com água destilada e colocaram-se a morder com Ácido Fosfomolibdico 1% durante 5 minutos. Foram novamente lavados com água destilada e corados pelo azul de anilina num tempo que variou entre 2 e 5 minutos.

Finalmente e após nova lavagem em água destilada foram desidratados os tecidos, diafenizados e posteriormente montados em meio resinoso.

Os resultados encontrados nos diferentes cortes foram de acordo com a técnica clássica, ou seja, os núcleos coraram de azul escuro, o colagénio de azul, as fibras musculares de vermelho, os eritrócitos de amarelo a laranja, os citoplasmas de vermelho, as estruturas nervosas de azul e o fibrinogénio de vermelho escuro.

Preparação de soluções:

As diferentes soluções usadas para o tricrómio foram preparadas de acordo com os protocolos clássicos, nas proporções que a seguir se descrevem:

Fucsina ácida:

- Fucsina ácida ----- 0,5 g
- Ácido Acético glacial --- 0,5 ml
- Água destilada ----- 99,5 ml

Ácido Fosfomolibdico a 1%:

- Ácido Fosfomolibdico ----- 1 g
- Água destilada ----- 100 ml

Azul de Anilina:

- Azul de Anilina ----- 2 g
- Ácido Acético glacial --- 2,5 ml
- Água destilada ----- 97,5 ml

3.5.3 Van Gieson

Princípio:

A técnica de Van Gieson foi usada por ser uma coloração simples, rápida e específica para as fibras de colagénio.

É uma coloração tricrómica composta por um corante nuclear e uma solução constituída por uma mistura de dois corantes ácidos (ácido picríco e fucsina ácida). O ácido picríco actua como diferenciador do azul-celeste e como corante para estruturas como, músculo, fibrina e eritrócitos, que possuem a capacidade de reter pequenas moléculas. A Fucsina-Ácida cora as estruturas mais laxas, como o colagénio por ser constituído por moléculas maiores e menos difusas.

Procedimento:

Os tecidos foram inicialmente desparafinados e hidratados. Depois, de forma sequencial foram corados os núcleos pela solução de azul-celeste. De seguida, as lâminas foram escurridas e coradas pela Hematoxilina de Gill durante 5 minutos. Foi feita de seguida a lavagem em água corrente e a diferenciação em álcool-ácido. Depois de bem diferenciados os tecidos foram lavados abundantemente durante 10 minutos e corados em seguida pela solução de picro-fucsina de Van Gieson durante 3 a 5 minutos.

Para finalizar, os cortes foram escurridos, lavados em água abundante, seguindo-se as fases de desidratação, diafenização e montagem.

Resultados:

Os resultados foram de acordo com os protocolos estabelecidos, ou seja os núcleos coraram de azul/preto, o citoplasma, músculo e glóbulos vermelhos de amarelo e o colagénio de vermelho.

Preparação de soluções:

As diferentes soluções usadas para o Van Gieson foram preparadas de acordo com os protocolos clássicos, nas proporções que a seguir se descrevem:

Azul Celeste

Azul Celeste B -----	2,5 g
Sulfato de Ferro Amónio -----	25 g
Glicerina -----	70 ml
Água destilada -----	500 ml

Dissolver o Sulfato de Ferro Amónio em água destilada fria com agitação, de seguida adicionar o Azul Celeste e ferver esta solução durante poucos minutos. Depois de a solução arrefecer, filtrar e adicionar a glicerina.

3.6 Técnica de Imuno-histoquímica

Os tecidos estudados foram submetidos a uma técnica imuno-histoquímica para avaliação da presença de actina, vimentina, desmina e p63 utilizando os anticorpos NCL-SMA, NCL-L-VIM-572, NCL-DESM-DERII e NCL-p63 (mouse monoclonal antibody, Novocastra Laboratories Ltd., Newcastle upon Tyne, UK), respectivamente.

Para este efeito, as lâminas com cortes histológicos foram desparafinadas durante 20 minutos em xilol e hidratadas numa série decrescente de álcoois até à água (álcool 100 % 5 minutos, álcool 100% 5 minutos, álcool 70% 5 minutos, álcool 50% 5 minutos e água corrente 5 minutos).

As amostras utilizadas foram fixadas com formaldeído tamponado a 10% e incluídas em parafina. O processo de fixação de tecidos em formaldeído proporciona a formação de ligações cruzadas que mascaram os epítomos antigénicos. Assim sendo, alguns anticorpos requerem recuperação antigénica para detectar o seu epitopo antigénico específico. Nesta série, com os anticorpos anti-vimentina e anti-actina não foi necessário proceder à recuperação antigénica visto que estes anticorpos detectam os seus epitodos antigénios específicos sem que seja necessário quebrar as ligações cruzadas provocadas pela fixação em folmaldeído. No entanto, para a detecção dos epitodos antigénicos p63 e desmina, foi necessário realizar a recuperação antigénica utilizando altas temperaturas. Neste trabalho, a recuperação antigénica foi efectuada com uma solução comercial (RA Epitope Retrieval Solution pH6, Novocastra Laboratories Ltd., Newcastle upon Tyne, UK) semelhante à solução de tampão citrato original (10mM, pH=6,0), em banho-maria a 98°C durante 30 minutos.

O sistema de detecção utilizado para a reacção de imuno-histoquímica foi um kit de detecção com polímero de peroxidase (Novolink Polymer Detection System, Novocastra Laboratories Ltd., Newcastle upon Tyne, UK), sendo que a detecção dos diferentes tipos de anticorpos foi efectuada seguindo as instruções do fabricante deste sistema de detecção: Bloqueio da Peroxidase endógena com a *Peroxidase Block*, durante 5 minutos; Inibição das reacções inespecíficas com *Protein Block*, durante 5 minutos; incubação dos anticorpos primários (anti-actina, diluição 1/200 e incubação durante 15 minutos à temperatura ambiente; anti-desmina, diluição 1/50 e incubação à temperatura ambiente durante 60 minutos; anti-vimentina, diluição de 1/200 e incubação à temperatura ambiente durante 30 minutos; anti-p63, diluição 1/10 e incubação à temperatura ambiente durante 60 minutos); incubação do reagente *Post Primary Block*, durante 30 minutos; Incubação com *Polymer*, durante 30

minutos; Revelação com DAB, durante 5 minutos. Após a marcação imuno-histoquímica, os cortes histológicos foram contrastados com Hematoxilina, durante 2 minutos, desidratados numa série crescente de álcoois (álcool 50 % durante 2 minutos, álcool 80% durante 2 minutos, álcool 95% durante 2 minutos, duas vezes álcool 100% durante 2 minutos), diafanizados em xilol e montados.

A precisão da técnica de imuno-histoquímica depende da obtenção de uma marcação altamente específica prevenindo a reacções inespecíficas do anticorpo primário no tecido. Na imuno-histoquímica é necessário assegurar que cada anticorpo é utilizado na diluição apropriada, não evapore durante a incubação e que seja removido completamente, se não estiver ligado, antes que o próximo reagente seja adicionado. Por esta razão em cada ensaio realizado foram incluídos lâminas com cortes histológicos de tecidos com presença dos epitopos antigénicos em questão e, antes da realização da técnica, procedeu-se à padronização das condições mais adequadas, adaptando-se para cada anticorpo primário, a utilização de recuperação antigénica e o tempo de incubação, temperatura e diluição do anticorpo primário. A técnica foi realizada em câmara húmida e cada corte foi isolado com caneta hidrofóbica. Em cada reacção, foram incluídos cortes histológicos de apêndice ileo-cecal como controlo positivo para o anticorpo anti-actina, anti-desmina e anti-vimentina, e cortes histológicos de próstata como controlo positivo para o anticorpo anti-p63.

Após a marcação imuno-histoquímica de todos os casos com os quatro anticorpos procedeu-se à avaliação das lâminas ao microscópio óptico.