

LOURENÇO BOZZO

LIPÍDIOS EM GENGIVA HUMANA NORMAL E
INFLAMADA : VERIFICAÇÃO HISTOQUÍMICA
E ESTUDO ESTRUTURAL

Tese apresentada à Faculdade de
Farmácia e Odontologia de Piraci-
caba, para obtenção do grau de
Doutor em Ciências (Patologia).

PIRACICABA

1965

19L
DOUTORADO

À minha mãe, que, com seu exemplo,
ensinou-me a lutar por ideais
verdadeiramente dignos.

À Vera Lúcia, minha espôsa
e Luciana, minha filha.

Ao Professor Dr. Benedicto de Campos Vidal,
Livre Docente e Professor de Patologia da Facul
dade de Farmácia e Odontologia de Piracicaba, o
orientador desta tese, incentivador e amigo de
tôdas as horas, o meu reconhecimento pelo muito
que tem feito pela minha formação científica.

Agradeço

Ao Professor Dr. Carlos Henrique Robertson Li
beralli, Diretor da Faculdade de Farmácia e Odon-
tologia de Piracicaba, que incansavelmente tem es-
timulado e amparado aquêles que se dedicam à pes-
quisa, procurando sempre o alevantamento do índi
ce cultural dessa instituição;

Aos meus colegas, assistentes da Cadeira de Pa-
tologia, pelo incentivo e colaboração que deram
na consecução desta tese;

A todos aquêles que, direta ou indiretamente
colaboraram na elaboração dêste trabalho.



1150015967



FOP

T/FFO B719L

LOURENÇO BOZZO

LIPÍDIOS EM GENGIVA HUMANA NORMAL E INFLAMADA:
VERIFICAÇÃO HISTOQUÍMICA E ESTUDO ESTRUTURAL.

Tese apresentada à Faculdade
de Farmácia e Odontologia de
Piracicaba, para obtenção do
grau de Doutor em Ciências.

(Patologia)

Piracicaba

1965

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
BIBLIOTECA

T334

N.º Classif. T/FFO

N.º autor 07596

V. _____

Tombo 60/5967

CM00186073-7

sub id 294437

ÍNDICE

1 - INTRODUÇÃO		
1.1 - Objetivos	pag.	7
1.2 - Justificativas	"	7
1.3 - Revisão da Bibliografia	"	8
2 - MATERIAL E MÉTODO		
2.1 - Generalidades	"	22
2.2 - Fixação	"	23
2.3 - Inclusão e Cortes	"	23
2.4 - Técnicas Histoquímicas	"	24
2.4.1 - Sudanofilia	"	24
2.4.2 - Teste de Baker	"	26
2.4.3 - Extração pela Piridina ...	"	27
2.5 - Técnica Histofísica	"	28
2.5.1 - Técnica de Medida	"	28
2.5.2 - Exemplo de Medida	"	31
2.5.3 - Sistematização das Medi- das	"	32
2.5.4 - Esquema Geral do Estudo Histofísico	"	34
3 - RESULTADOS		
3.1 - Fixação, Inclusão e Cortes por Congelação	"	36

3.2	-	Técnicas Histoquímicas	pag.	36
3.2.1	-	Sudanofilia	"	36
3.2.2	-	Teste de Baker	"	44
3.2.3	-	Teste de Extração por Pi ridina	"	45
3.3	-	Técnica Histofísica	"	48
3.3.1	-	Gengiva Normal: 1ª Série.	"	48
3.3.2	-	Gengiva Normal: 2ª Série.	"	50
3.3.3	-	Gengiva Inflamada: 3ª Sé rie	"	54
4	-	DISCUSSÃO		
4.1	-	Técnicas Histoquímicas	"	61
4.1.1	-	Sudanofilia	"	61
4.1.2	-	Teste de Baker e Extra- ção por Piridina	"	67
4.2	-	Técnica Histofísica	"	70
4.2.1	-	Gengiva Normal: 1ª Série.	"	71
4.2.2	-	Gengiva Normal: 2ª Série.	"	72
4.2.3	-	Gengiva Inflamada: 3ª Sé rie	"	74
5	-	CONCLUSÕES	"	77
6	-	RESUMO	"	79
		RESUMO EM FRANCÊS (RÉSUMÉ)	"	81
		RESUMO EM INGLÊS (SUMMARY)	"	84
7	-	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	"	86

"LIPÍDIOS EM GENGIVA HUMANA NORMAL E INFLAMADA:
VERIFICAÇÃO HISTOQUÍMICA E ESTUDO
ESTRUTURAL."

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - Objetivos

Os objetivos da presente pesquisa são:

A - Determinar a presença e distribuição de lipídios na gengiva humana.

B - Determinar as variações de distribuição dos lipídios na gengiva clinicamente normal e inflamada.

C - Determinar a organização estrutural dos lipídios no epitélio gengival e, conseqüentemente, sua interação estrutural com a queratina.

1.2 - Justificativas

Destas determinações poderão advir importantes informações sôbre a estrutura epitelial, não só da gengiva, mas de todos os epitélios semelhantes. Melhor compreensão das funções biológicas da camada epitelial deverá fundamentar-se sôbre melhor conhecimento da ultra-estrutura da queratina e suas interações com lipídios, especialmente fosfoli

pídeos. Propõe-se esta pesquisa, demonstrar na gengiva humana, a presença de lipídios na camada queratinizada e sua participação na birrefringência dessa camada.

Dessa comprovação da participação de lipídios na birrefringência da camada queratinizada, resultará, como consequência, positivar-se sua estruturação molecular ordenada e sua interação com a queratina, fenômeno da mais alta importância para a conceituação das finalidades biológicas deste tipo de revestimento.

1.3 - Revisão da Bibliografia

Na introdução do capítulo de lipídios e lipoproteínas, do seu clássico tratado de Histoquímica, LISON (1960 A) diz: " O capítulo dos lipídios é certamente um dos mais interessantes e cremos que êle não cessará de ganhar em importância. Poucos pesquisadores se têm preocupado seriamente dos aspectos morfológicos e histoquímicos dos corpos graxos realmente importantes, que são aqueles que entram na constituição da célula e que participam do seu metabolismo íntimo".

ENGSTRON e FINEAN (1958) realçam as dificuldades encontradas ao se estudar as proprieda-

des dos lipídios, em virtude da possibilidade dessas moléculas se associarem com outros sistemas lipídicos mistos, nos quais, as propriedades dos componentes individuais são modificadas. Ressaltam a importância do ponto de vista da ultraestrutura biológica, da possibilidade de ácidos graxos, fosfolipídios, colesterol e ésteres de colesterol existirem lado a lado, numa única camada lipídica de espessura constante, formando um sistema.

ONCLEY (1961) afirma que muito do material lipídico que agora se crê como "lipídio livre" nas células, poderá, em futuro breve, verificar-se estar em íntima ligação molecular com proteína, glicoproteína ou carboidratos.

Realça ainda que o modo de ligação dessas estruturas lipídicas à porção peptídica de uma lipoproteína é pouco conhecida. A desnaturação protéica e as extrações com solventes de gorduras são suficientes para dissociar completamente os complexos lipoprotêicos, de tal forma que, se qualquer ligação covalente estiver presente, ela deverá ser muito lábil.

Conhecem-se muitos lipo-polissacarídeos, e encontram-se lipídios firmemente ligados com algumas glicoproteínas. É possível que a fração car-

boidrato dessa complexa macromolécula possui uma ligação covalente para a molécula lipídica.

HALE (1958) notou que em muitas células, os lipídios estão ligados a proteínas ou carboidratos, dificultando o estudo das suas propriedades, especialmente do seu índice de refração.

ADAMS e BAYLISS (1962) estudando a liberação de proteínas, lipídios e polissacarídeos da elástica arterial, por enzimas proteolíticos e solventes lipídicos, observaram que alguns lipídios estão ligados a proteínas, de tal forma que não podem ser completamente extraídos por solventes, a menos que as ligações proteína-lipídio sejam dissociadas; e que a piridina remove apenas parcialmente os fosfolipídios.

TEN CATE (1963) estudando a distribuição da fosfatase ácida, de esterase não específica e lipídios no epitélio oral, humano e de macaco, observou que os locais de atividade enzimica e lipídios pareciam coincidir. Considerou estes achados como indicativos da existência de lisosomas ou partículas semelhantes a lisosomas no epitélio oral. Nas células mais superficiais do epitélio não queratinizado, os lisosomas eram grandes, poucos e irregularmente distribuídos. Constatou também a presença de gor-

dura neutra.

GIBBONS (1963) estudando a regeneração epitelial no palato de rato, com microscópio eletrônico, durante as primeiras doze horas após a lesão, observou que o citoplasma das células que migravam apresentavam massas uniformemente densas que foram interpretadas como lipídios.

O autor também descreveu a presença de corpos densos vesiculados os quais foram interpretados como lisosomas.

BOZZO e VALDRIGHI (1964) determinaram a presença de lipídios na gengiva de rato e de coabaia. Observaram uma predominância de fosfolipídios na camada queratinizada, enquanto nas camadas espinhosa e basal parecem predominar lipídios outros que não fosfolipídios. Nas células mais superficiais da camada granulosa notaram ainda a distribuição irregular de fosfolipídios sob a forma de grânulos localizados no citoplasma e nos espaços intercelulares.

THONARD e SCHERP (1962) observaram que o epitélio oral contém mucopolissacarídeo ácido nos espaços intercelulares. Uma parte dessa substância cementante intercelular não foi removida por polissacarases conhecidas, podendo ser condroitin sulfato B. e/ou componente (s) tecidual (s) desconhecido.

do (s) dando reações de coloração característica de mucopolissacarídeo.

ENGEL et alii (1950) estudando a patogênese da gengivite descamativa, sugeriram que, nesta, as transformações eram devidas em parte à produção de quantidades anormais de enzimas despolimerizantes, os quais afetavam a substância fundamental e a substância cementante das células epiteliais.

FLESCH e ESODA (1962) estudando a camada queratinizada da epiderme normal e patológica, isolaram um material gorduroso firmemente ligado à trama queratinizada. Descreveram-no como uma substância complexa, com funções aparentemente cementantes. Afirmaram ainda que os mucopolissacarídeos, que durante a queratinização normal da epiderme sofrem decomposição, não ocorrem aí de maneira livre, mas estão combinados, formando uma grande molécula, aparentemente um glicoproteolipídio. Aos lipídios da epiderme atribuíram importante papel na patogênese das doenças de pele. A origem do complexo glicoproteolipídio é obscura, podendo contudo, estar nos grânulos queratohialinos que se tornam intimamente relacionados com os filamentos de queratina durante o processo de queratinização.

CHEVREMONT (1956) analisando o pro-

cesso de queratinização em células epidérmicas, observou o aparecimento de lipídios nas células em degenerescência cornificada, isto no curso das transformações que as células apresentam na queratinização.

Tais lipídios são colesterídios, fosfolipídios, talvez glicerídios, e sobretudo colesterol sob a forma livre. O colesterol pode ser determinado histoquimicamente desde a camada de Malpighi. Os ácidos graxos aparecem no momento da degeneração celular na parte superficial da camada granulosa. Na camada cornificada são encontrados ácidos graxos livres e ésteres de colesterol.

ROTHMAN (1954) observou que existe um equilíbrio bem regulado entre a concentração de fosfolipídio e a de esterol na pele. A atividade bioquímica dos fosfolipídios é regulada pela presença de colesterol, havendo perfeita analogia entre os achados microscópicos e a análise química.

Enquanto nas camadas inferiores da epiderme a quantidade de fosfolipídio é considerável, na camada queratinizada é grandemente reduzida. Durante a queratinização somente metade do colesterol desaparece enquanto que o fosfolipídio desaparece quase completamente.

CABRINI e CARRANZA (1958) estudando a distribuição histoquímica da fosfatase ácida em gengiva humana normal e inflamada, mostraram que o ênzimo está localizado quase que exclusivamente no epitélio.

Havia grande reação nas camadas superficiais (menos na queratinizada que é isenta de fosfatase ácida) com gradual diminuição em direção à camada basal. Acreditam que haja relação entre a fosfatase ácida e queratinização, pois as áreas de maior atividade enzimica correspondem às camadas imediatamente subjacentes à queratinizada, onde parecem ocorrer trocas bioquímicas que levam à formação de queratina. Desde que a queratina se forma, o ênzimo desaparece total ou parcialmente. Em áreas não queratinizadas há uma grande redução da atividade de fosfatase ácida. Mas êstes autores não fazem referência alguma quanto às possíveis relações entre corpos graxos e êstes ênzimos.

PRZELECKA et alii (1962) estudando a localização citoquímica de fosfolipídios, fosfatase ácida e alcalina, em oocitos de Rana temporaria, notaram uma possível correlação entre a síntese de fosfolipídios e a atividade da fosfatase alcalina.

WEINMANN (1940) estudando a querati-

nização da mucosa oral humana, observou que a camada média do epitélio era constituída de células que estavam em processo de queratinização, e a camada superficial, de células completamente cornificadas.

McLeod (1899) citado por Weinmann, considera a queratohialina como um produto de separação do protoplasma celular, que aparece quanto a vitalidade da célula diminue; e a eleidina, um ulterior produto da mesma substância, é provàvelmente a gordura ou materia graxa, que está presente na camada queratinizada.

WEINMANN e MEYER (1959) relacionando inflamação, deposição de glicogênio e queratinização da gengiva humana, observaram um estágio transicional entre completa queratinização e paraqueratose. Sugeriram então a seguinte classificação: queratinização completa, paraqueratose, paraqueratose incompleta e não queratinização. Não relacionaram o processo com presença de corpos graxos.

MC HUGH (1964) estudando a queratinização do epitélio gengival e da pele, observou grande quantidade de birrefringência na camada mais superficial do epitélio, tanto da pele como da gengiva aderida, sendo maior a birrefringência da pele. À medida que as células migram, o núcleo e o nucléolo se vão rompendo progressivamente; as células aumen-

tam de tamanho e se tornam achatadas; aparecem os grânulos queratohialinos no citoplasma, e finalmente nas camadas superficiais se convertem em queratina fibrosa.

Observou ainda que a birrefringência das fibrilas nas camadas celulares profundas era orientada perpendicularmente à superfície.

GERSTEIN (1963) estudando a presença de fosfolipídios em pele normal e com psoríase, observou maior concentração desta substância nos casos de psoríase. Acredita que o aumento de celularidade e acantose poderiam explicar o aumento de conteúdo fosfolipídico em pele com psoríase.

ZELICKSON (1961) com auxílio do microscópio eletrônico, estudou em pele humana normal o processo de queratinização, tendo chegado às seguintes conclusões:

1 - As células basais possuíam numerosos tonofilamentos citoplasmáticos, todos orientados no mesmo plano e perpendiculares à superfície. Estes filamentos eram osmiofílicos, e com grande aumento, pareciam consistir de um filamento central não corado, envolvido por uma substância osmiofílica assumindo aspecto de tubo.

2 - Na camada espinhosa os tonofilamentos au

mentam gradualmente de tamanho.

3 - Na camada granulosa, com grande aumento, foi possível observar em alguns grânulos eletrodensos, uma estrutura interna, que era aparentemente de vida aos filamentos.

4 - Imediatamente abaixo do estrato córneo, células morfológicamente diferentes eram vistas ocasionalmente. Estas células transicionais continham numerosos grânulos queratohialinos, preenchendo o citoplasma. A este nível, os desmosomas não apresentavam suas modificações finais.

5 - No estrato córneo, observou o aspecto de filamentos paralelos à superfície, envolvidos por uma substância cementante eletro-densa. O padrão de desenvolvimento do estrato córneo era inconstante.

O desmosoma também mudava de maneira característica. Um corpo osmiofílico (200 Å) formava-se no espaço entre 2 membranas celulares opostas. Ressalta ainda a importância da substância cementante na queratinização, que, por reagir fortemente com o tetróxido de ósmio, provavelmente conteria enxofre.

BRODY (1959 A) estudando a ultraestrutura dos grânulos de queratohialina e o seu papel no processo de queratinização, mostrou que os grânulos estão dispersos por todo o citoplasma e não ao re

dor do núcleo.

Embora se tenha descrito como abrupta a transição do estrato granuloso ao córneo, no presente trabalho o autor mostrou a presença de células transicionais cujos citoplasmas mostravam características da camada granulosa e da cornificada.

SWANBECK (1959) estudando as fibras de queratina da pele por meio da difração de raios X, observou que a agregação de tonofibrilas numa fibra de 260 Å na camada cornificada é considerada como a principal fase no processo de queratinização da epiderme.

CHARLES (1959) também acreditou que a coesão das camadas cornificadas é dependente de remanescentes dos pontos de contacto intercelulares, da camada espinhosa.

MATOLTSY e MATOLTSY (1962) através de estudos com microscópio eletrônico, mostraram que as células granulosas da epiderme do rato recém-nascido continha grandes e numerosos grânulos queratohialinos consistindo de uma substância altamente osmiofílica as sociada com filamentos citoplasmáticos. Realizando tes tes histoquímicos mostraram a ausência de grupos S-S-e - SH - nos grânulos queratohialinos.

Testes positivos para S-S- foram nota dos na camada córnea.

COON et alii (1963) observaram que os ácidos graxos livres são produzidos na epiderme, sendo provavelmente incorporados à queratina ou à uma substância cementante glicoprotéica durante o processo normal de queratinização; daí, somente pequena quantidade chega à superfície da pele, aparecendo como uma película lipídica superficial. Nas alterações da pele, pode haver uma falha na incorporação desses ácidos graxos à queratina ou à glicoproteína cementante.

Em qualquer caso, os resultados sugerem que algum defeito no metabolismo de lipídios ocorra na pele com psoríase.

ZELICKSON e HARTMANN (1962) estudando a mucosa oral, humana, normal, não queratinizada observaram que o aparelho de Golgi, composto em parte por grupo de pequenas vesículas, é bem desenvolvido e localizado nos polos opostos do núcleo. As mitocôndrias são abundantes e como degeneram, provavelmente dão origem às vesículas.

BRODY (1959 B), com microscópio eletrônico observou que o espaço entre as células epidermais da pele de cobaias era preenchido com uma substância de fraca opacidade. Nesta substância intercelular foram encontradas a intervalos pequenos,

corpos opacos e difusos. Levantou a hipótese segundo a qual a queratina era formada dos tonofilamentos e do material do grânulo queratohialino, parcialmente, através de uma gradual incorporação de tonofilamentos nos grânulos de queratohialina. O material queratohialino poderia então formar o componente interfilamentoso.

CANTAROW e SCHEPARTZ (1962) revendo a distribuição intracelular de lipídios afirmou que a fase solúvel do citoplasma contém principalmente, gorduras neutras, enquanto fosfolipídios estavam confinados mais ao núcleo, mitocôndria e microsomas. Os lipídios nucleares estavam confinados no nucléolo e na membrana nuclear e que, praticamente, todos os fosfolipídios da célula ocorriam como complexos lipoproteicos.

FLORKIN (1959) ressaltou a epiderme como uma das sedes importantes da síntese de colesterol. Os fosfolipídios estavam particularmente concentrados nas células das camadas profundas da epiderme baixando seu conteúdo na camada cornificada, que não contém mais que 0,15% (do peso de resíduo sêco). Os fosfolipídios desapareceriam quase totalmente ao curso da queratinização. Esta desapareição ligada àquela das mitocôndrias resultou de uma forte libera-

ção de colina.

A degradação dos fosfolipídios libera assim ácidos graxos, de sorte que o colesterol apresenta-se em grande parte sob a forma de éster.

HILLARP e OLIVECRONA (1946) com microscópio de polarização, fizeram um estudo das proteínas estruturais e lipídios orientados no citoplasma de células epiteliais de diversos órgãos de rato.

Através de polarização ótica observaram que o citoplasma de muitas células epiteliais tinha uma estrutura molecular particular, mostrando uma disposição baso-apical, formada por cadeias polipeptídicas, arranjadas ao longo eixo da célula.

Elas funcionavam como uma estrutura de orientação para lipídios, cujas moléculas anisodiamétricas estavam orientadas em ângulo reto à estrutura. Certos epitélios apresentavam diferenciações citoplasmáticas, mostrando em princípio o mesmo aspecto.

2 - MATERIAL E MÉTODO

2.1 - GENERALIDADES

No presente trabalho foi utilizada a gengiva humana de pacientes do sexo masculino.

As biópsias foram executadas na região vestibular sob anestesia local. Procurou-se observar as condições clínicas da gengiva (Côr, textura, consistência, etc.) classificando-as em: gengiva normal, gengivite crônica e gengivite sub-aguda. Diagnosticou-se gengiva normal, áquela que clínicamente apresentava aspectos de normalidade, (embora histológicamente seja comum observar-se pequena quantidade de infiltrado inflamatório); gengivite crônica, àque la que clínicamente apresentava inflamação, porém, com sinais de proliferação, e que, histológicamente, se caracteriza por um intenso processo proliferatiuvo. Finalmente, chamou-se gengivite sub-aguda, àque les casos, nos quais, clínicamente, o processo inflamatório era mais intenso, e que histológicamente predominam fenômenos exudativo-vasculares.

Observou-se ainda a idade, e a côr da pele do paciente.

tura a 60°C por tempo variável entre 60 e 120 minutos, sendo em seguida incluídas numa mistura recentemente preparada.

Outra parte dessas biópsias, foi cortada por congelação.

Tanto nas gengivas incluídas como nas cortadas por congelação, a espessura dos cortes foi de aproximadamente 10 microns.

2.4 - TÉCNICAS HISTOQUÍMICAS

Para a determinação histoquímica de lipídios em gengiva humana utilizaram-se as seguintes técnicas: Sudano-filia, Teste de Baker e extração por Piridina.

2.4.1 - Sudano-filia

A demonstração de lipídios pelo Sudan negro foi feita segundo a técnica recomendada por Lison (1960 C), variante inédita.

Esta coloração foi feita tanto em gengivas normais como em inflamadas, após os seguintes tratamentos:

A) Fixação em formol-cálcio por 6 horas, seguidas de post-cromização pelo bicromato-cálcio (bi

cromato de potássio 5 g + cloreto de cálcio anidro 1 g + água destilada 100 C.C.) por 18 horas, à temperatura ambiente, e por mais 24 horas à 60º C. A peça era lavada em água corrente por 12 horas e incluída em polietileno glicol.

B) Fixação em Bouin durante 20 horas, passando a seguir pelo álcool 70% por 1 hora, pelo álcool 50% por 30 minutos. Lavava-se por 30 minutos em água corrente, colocando na piridina pura à temperatura ambiente por 1 hora, em nova piridina por mais 1 hora. Transferia-se para a piridina a 60º C por 24 horas, lavava-se em água corrente por 2 horas, transferindo-se ao bricromato-cálcio à temperatura ambiente por 18 horas, e por mais 24 horas à 60º C. A peça era então lavada por 12 horas e incluída em polietileno glicol.

C) Fixação em Bi-Bi, processo preconizado por Elftman (1957), tendo porém, no presente trabalho, sido usada a concentração já citada, recomendada por Valeri (1964). Após a fixação por 24 horas à temperatura ambiente, a peça era lavada por 12 horas em água corrente, e incluída em polietileno glicol.

Coloração

Os blocos foram então cortados com espessura de 10 microns, sendo os cortes recolhidos em

água destilada e a seguir passados pelo álcool 60 %, pelo Sudan negro dissolvido em álcool 60% (solução saturada e filtrada), passados pelo álcool 50%, transferidos à água destilada e montados em xarope de Apty.

Esta mesma coloração foi feita nas gengivas cortadas por congelação. As gengivas assim cortadas, haviam sido fixadas em formol-cálcio, seguidas de post-cromização, e pelo Bouin, seguido da extração em piridina, da maneira acima mencionada, excluindo-se, é claro, a inclusão.

2.4.2 - Teste de Baker

Tôdas as gengivas fixadas em formol-cálcio com post-cromização pelo bicromato-cálcio, foram utilizadas para a realização da reação de Baker, ou teste da hemateína ácida; tanto as gengivas incluídas como as cortadas por congelação.

Os cortes foram recebidos em água distilada, colocados numa solução de bicromato-cálcio a 60º C por 1 hora, lavados em água destilada por 5 minutos e colocados a 37º C por 5 horas numa solução de hemateína ácida (0,05 g. de hematoxilina + 48 C.C. de água destilada + 1 C.C. de iodato de sódio a 1%). Os cortes eram então lavados em água destilada, deixados

por 18 horas a 37º C numa solução de bórax-ferricianeto (ferricianeto de potássio 0,25 g + Bórax 0,25 g. + água distilada 100 C.C.), lavados por 10 minutos em água distilada renovada e montados em glicerina gelatina ou xarope de Apaty.

2.4.3 - Extração pela Piridina

A extração pela piridina é uma reação contróle para o teste de Baker. Num lote de gengivas, cada biópsia foi dividida ao meio, sendo metade fixada em formol-cálcio, para o teste de Baker e a outra metade fixada em Bouin e feito o teste de extração pela piridina.

Após a fixação por 20 horas em Bouin, era feita a extração pela piridina, conforme já mencionamos. Os cortes, tanto das gengivas incluídas como das cortadas por congelação, a seguir eram tratados pelo bicromato-cálcio a 60º C por 1 hora, lavados em água distilada por 5 minutos, colocados a 37º C por 5 horas numa solução de hemateína ácida, lavados em água distilada, deixados por 18 horas a 37º C numa solução de bórax-ferricianeto, lavados 10 minutos em água distilada renovada e montados em glicerina-gelatina ou em xarope de Apaty.

**

2.5 - Técnica Histofísica

Para estudo histofísico utilizaram-se medidas de retardo ótico (R.O) da camada epitelial superficial e dos espaços intercelulares da camada espinhosa.

As variações dos R.O. correspondentes à remoção dos lipídios pelo tratamento por piridina, refletirão a participação dos lipídios na birrefringência das camadas superficiais e dos espaços intercelulares.

Desde que a birrefringência é igual ao retardo ótico dividido pela espessura do corte ($B = R.O./e$), poder-se-á trabalhar só com os R.O. uma vez que as medidas serão efetuadas nos mesmos locais. Desta forma, as variações dos R.O. serão uma indicação da variação da birrefringência.

2.5.1 - Técnica de Medida

As medidas dos retardos óticos (R.O.) foram feitas em gengivas fixadas em Bi-Bi, incluídas em polietileno glicol ("carbowax") e cortadas com 10 microns de espessura. Estas medidas foram efetuadas "Antes e Depois" da lâmina ser submetida a um tratamento por piridina (24 horas a 60°C) para remoção de lipídios. Os cortes foram recebidos em água e montados em lâmina, usando-se como meio de embebição a água destilada. As medidas de R.O. foram efetuadas no

fotomicroscópio Zeiss Pol Interferencial * com luz monocromática de 550 milimicrons, usando-se compensador Brace-Köhler $1/10 \lambda$ (um décimo de comprimento de onda). Êste compensador é do tipo de retardo ótico fino e de azimute variável.

Consta êle, de um disco de mica montado em um sistema de engrenagens que faz girar o disco de mica.

A rotação é medida por um goniômetro e vernier que fazem parte do tambor que faz girar o conjunto.

Para efetuar-se a medida é preciso:

A) Estarem o analisador e o polarizador cruzados.

B) Verificar o completo enegrecimento do campo.

C) Usar luz de lâmpada de mercúrio (usou-se a lâmpada HBO da Zeiss.

D) Usar filtro monocromador especial (usou-se no presente trabalho filtro de 550 milimicrons).

E) Introduzir o compensador na fenda apropriada entre o analisador e o compensador; quando os índices de leitura do tambor marcam 0 (zero) o campo deixa de estar negro e passa a brilhar.

* = Doação parcial da "Fundação de Amparo à Pesquisa", ao laboratório de Patologia da F.F.O.P.

F) Determinar então o ângulo de extinção do compensador $\hat{E}c$. (No presente caso foi de 45 graus).

G) Tirar o compensador. Colocar na platina do microscópio o preparado a ser examinado e medido.

Determinar a posição de extinção da sua birrefringência. Com uma rotação da platina conduzir o preparado a 45 graus da sua posição de extinção. Agora estará manifesta a birrefringência do mesmo.

H) Colocar novamente o compensador na fenda e fazer com que o mesmo esteja em sua posição de extinção (no presente trabalho $\hat{E}c = 45$ graus).

I) Obter a compensação da birrefringência do espécime em exame, girando o tambor do compensador. A compensação é conseguida quando o brilho do material birrefringente é escurecido, enquanto o campo em tórno do mesmo fica claro. (fig. 8 b).

Nestas condições, o eixo do compensador (eixo de menor velocidade de transmissão da luz no compensador) gira para o quadrante oposto a 90 graus do eixo do objeto em questão, (posição de subtração).

Em particular, nesta pesquisa, a camada gengival superficial, birrefringente, era colocada com o seu eixo superficial no sentido Noroeste-

Sudeste (NO-SE).

J) O ângulo verdadeiro de compensação era me dido subtraindo-se de 45 graus (que é o ângulo de ex tinção do compensador) o valor angular achado para obter-se a compensação visual.

K) A partir d'êste ângulo, calculava-se o re tardo ótico (Zeiss-Instruções para uso do compensador, segundo Brace-Köhler, nº G. 40-557 c - XII 56 B0.)

$$RO_0 = RO \text{ comp. sen. } 2 d$$

RO = retardo ótico do objeto.

RO com. = retardo ótico do compensador para deter minados comprimentos de onda. (Na presente pesquisa, como foi usada luz monocromática de 550 milimicrons, o valor de RO com. foi: 47,20 milimicrons.

sen. 2 d = seno de duas v'êzes o ângulo de comp ensação.

2.5.2 - Exemplo de Medida

Uma vez colocada a amostra a ser me dida, uma camada epitelial superficial queratinizada, e, obedecendo todos os passos já descritos, obte ve-se o seguinte valor angular para a compensação: 39,5 graus.

O ângulo verdadeiro de compensação é igual a $45-39,5 = 5,5^\circ$.

Calculando-se o R.O._o tem-se:

$$R.O._o = 47,20 \times \text{sen. } 11^\circ \quad R.O._o = 9,0057 \text{ milimicrons}$$

2.5.3 - Sistematização das medidas

Como já foi dito anteriormente, as medidas "Antes e Depois" eram efetuadas sempre no mesmo ponto de cada corte, para se conservar a identidade da espessura. Isto era conseguido anotando-se os números identificadores dos nônios da platina giratória do microscópio.

Para verificação da variação do R.O., devida ao tratamento pela piridina, e também da variação do R.O. devida ao processo inflamatório, procedeu-se às seguintes medidas:

1ª Série: Efetuadas em 10 lâminas escolhidas ao acaso, de uma mesma gengiva clinicamente normal. As leituras foram efetuadas na camada superficial do epitélio, antes (A) e depois (D) do tratamento de extração dos lipídios pela piridina.

2ª Série: Efetuadas na superfície e nos espaços intercelulares de 11 cortes escolhidos ao acaso de 11 gengivas normais, também escolhidas ao acaso. Também aqui se procedeu às medidas "Antes e Depois" do

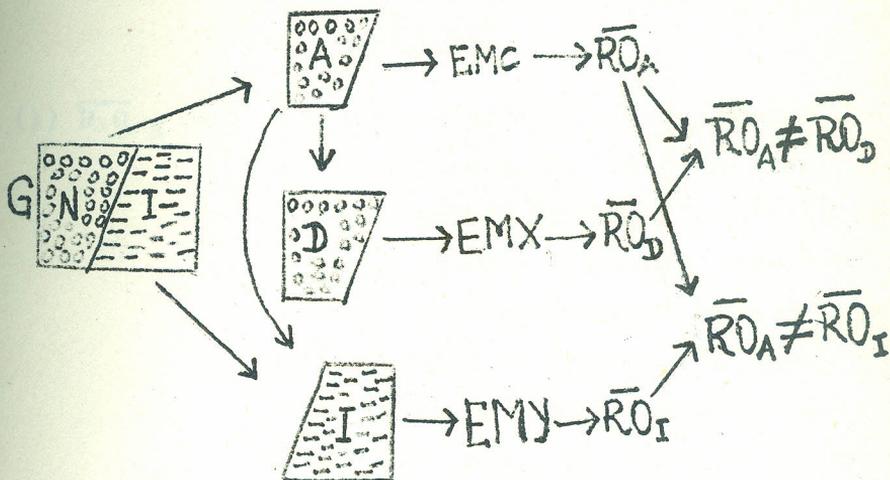
tratamento pela piridina.

3ª Série : Efetuadas na camada superficial e nos espaços intercelulares de 11 cortes obtidos de 11 gengivas inflamadas, tôdas escolhidas ao acaso. Não se fez a extração pela piridina pois não se desejava estudar nesta série, senão a ação do fator inflamação.

Resumindo-se têm-se:

- | | | | | | |
|---|---|------------|---|--------------|--|
| G | { | 1ª Série { | { | Normal { | Camada superficial: Antes e Depois. |
| | | 2ª Série { | | Normais { | Espaços intercelulares: Antes e Depois. |
| | | 3ª Série { | | Inflamadas { | Camada superficial: Antes.
Espaços intercelulares: Antes. |

2.5.4 - ESQUEMA GERAL DO ESTUDO HISTOSÍFICO



Símbolos usados:

- G = conjunto total de gengivas em estudo
- N = número total de gengivas normais
- I = número total de gengivas inflamadas
- A = número total de gengivas normais antes do tratamento por piridina.
- D = número total de gengivas normais depois do tratamento por piridina.
- E.M.C. = estruturação molecular completa (normal).
- E.M.X. = estruturação molecular após remoção de lípidios.
- E.M.Y. = estruturação molecular da gengiva inflamada.

$\overline{R.O.}$ = média dos retardos óticos.

HIPÓTESES

(1) $\overline{R.O.}_A \neq \overline{R.O.}_D$ = Retardo ótico " Antes " diferente do retardo ótico " Depois ". Primeira hipótese do estudo estrutural dos lipídios na gengiva humana normal. A comprovação desta hipótese significará a participação de lipídios na estruturação molecular da gengiva normal.

(2) $\overline{R.O.}_A \neq \overline{R.O.}_I$ = Retardo ótico " Antes " diferente do retardo ótico da gengiva inflamada. Segunda hipótese do estudo estrutural dos lipídios na gengiva humana. A comprovação desta hipótese significará que o processo inflamatório determina uma variação de birrefringência, que poderá ser interpretada como possível desordem estrutural.

3 - RESULTADOS

Os resultados serão descritos na mesma ordem de apresentação do material e método.

3.1 - Fixação, Inclusão e Cortes por Conge lação.

Os resultados dêstes procedimentos se rão descritos com seus principais detalhes, ao relatarem-se os resultados das técnicas histoquímicas e histofísicas.

Contudo, já podemos descrever o fato de que os cortes obtidos através da inclusão em polietileno glicol"(carbowax)" foram muito mais homogêneos que aquêles obtidos por congelação. As gengivas assim incluídas forneceram maior número de cortes,permitindo ainda sua estocagem para posterior utilização.

3.2 - Técnicas histoquímicas

3.2.1 - Sudanofilia. As reações de coloração pelo Sudan negro ("Sudan Black B"), foram positivas tanto nas gengivas fixadas em formol-cálcio, como nas fixadas em Bi-Bi, mostrando entretanto, maior intensidade de coloração nestas últimas.

A sudanofilia mostrou os seguintes as

pectos da distribuição de lipídios na gengiva:

A) Com pequeno aumento, (10x10), a camada epitelial superficial queratinizada apresentou-se fortemente sudanófila, tanto na gengiva normal, onde forma uma faixa contínua, uniforme e constante, como na gengiva inflamada onde é irregular, com soluções de continuidade (foto 1).

B) Com aumento maior (10x45), a sudanofilia da camada superficial queratinizada apresentou um aspecto lamelar, estratificado (foto 2). Em gengivas inflamadas era comum a falta de zonas de queratinização, vendo-se na superfície epitelial, células da camada granulosa com o citoplasma carregado de materiais sudanófilos.

C) Nas pérolas queratínicas, assim como no conteúdo dos cistos gengivais, ocasionalmente encontrados nas gengivas inflamadas, observou-se uma intensa sudanofilia (foto 3).

D) A sudanofilia observada nos espaços intercelulares foi nítida e constante, tanto na gengiva normal como na inflamada (foto 2).

E) Observou-se um material intensamente sudanófilo, especialmente condensado nos polos nucleares (foto 4). Êste material, que nas camadas inferiores do epitélio, apresentava-se nos pelos basais e a

picais, à medida que se aproxima da camada espinhosa superficial, passa a ocupar os polos laterais do núcleo. Como as células se achatam, este material sudanófilo, citoplasmático, parece assumir uma disposição linear, paralela à superfície (foto 2 e 4).

F) Abaixo do epitélio, na lâmina própria da gengiva, a maior sudanofilia foi observada nas bainhas de mielina, paredes vasculares e hemáceas. Nas gengivas inflamadas, pôde-se constatar a degeneração das bainhas de mielina, dando origem a massas sudanófilas. Em tórno das bainhas de mielina em degeneração, observou-se também um infiltrado inflamatório do qual, pode-se ver plasmocitos e elementos histiocitários, todos contendo material sudanófilo no seu citoplasma (foto 5).

G) Após a extração por piridina, os cortes não se coravam pelo Sudan negro.

Figura 1

Fotomicrografia mostrando sudanofilia na camada superficial queratinizada de gengiva inflamada (gengivite crônica)

Observa-se também que a camada basal apresenta-se sudanófila, (sudanofilia citoplasmática).

Aumento original: 10x10.

Figura 2

Corte de gengiva inflamada. Fotomicrografia mostrando sudanofilia da camada superficial e espaços intercelulares.

Observa-se também a sudanofilia nos polos de alguns núcleos, e o aspecto estratificado, lamelar, do material sudanófilo.

Aumento original: 10x45.

Figura 3

Gengivite crônica. Fotomicrografia mostrando ausência de camada queratinizada, e irregularidades da sudanofilia superficial.

Abaixo do epitélio, observa-se um cisto gengival com o seu conteúdo intensamente corado pelo Sudan negro.

Aumento original: 10x10

Figura 4

Corte histológico de gengiva inflama
da corado pelo Sudan negro.

Observa-se uma condensação de mate-
rial lipídico nos polos nucleares.

Aumento original: 100x10.

Figura 5

Corte histológico de gengiva inflamada corado pelo Sudan negro.

Nota-se a desintegração da bainha de mielina, com liberação de lipídios; nas proximidades, células histiocitárias, tendo no citoplasma material lipídico.

Aumento original: 10x45.

3.2.2. - Teste de Baker

Os resultados obtidos com o teste de Baker, ou teste da hemateína ácida, mostraram os seguintes aspectos:

A) Camada superficial queratinizada intensamente Baker-positiva, formando uma faixa negra, compacta que recobre todo o epitélio gengival (foto 6).

B) Como foi descrito para a sudanofilia, as pérolas de queratina e os cistos gengivais também eram fortemente Baker-positivos.

C) Observaram-se células com o citoplasma cheio de granulações Baker-positivas. Estas células foram vistas na camada granulosa e em células superficiais nos casos de paraqueratoses e descamação, com o aparecimento da camada granulosa na superfície, (fotos 6 e 7).

D) Nos casos de gengiva inflamada, na fase exudativa vascular (aquí chamada sub-aguda), observou-se ausência de substâncias Baker-positivas na superfície. Quando predominavam os processos proliferativos (gengivite crônica), a quantidade de substâncias Baker-positivas na superfície variava bastante. Ora servia uma camada superficial Baker-positiva espessa, ora células isoladas contendo material Baker-po-

sitivo.

Outras vezes ainda, notavam-se massas Baker-positivas formando verdadeiros grumos, também irregulares na distribuição e inconstantes na presença.

E) Abaixo do epitélio, as bainhas de mielina e as hemáceas eram fortemente Baker-positivas na gengiva normal e gengivite crônica. Na gengivite sub-aguda um quadro ligeiramente Baker-positivo, denunciava a desintegração da bainha de mielina. Este aspecto era idêntico ao observado com a sudanofilia (foto 5).

3.2.3 - Teste da Extração por Piridina

No teste da extração por piridina os resultados foram irregulares. Raramente, observou-se a remoção total de lipídios da camada queratinizada. O quadro mais constante observado nos cortes submetidos a este tratamento foi o da remoção parcial, restando quase sempre na camada superficial queratinizada uma certa quantidade residual de substâncias coráveis pela hemateína-ácida. Por outro lado, os núcleos que no teste de Baker não se coravam pela hemateína-ácida, após a extração de lipídios pela piridina, ficavam perfeitamente corados. No tecido conjuntivo (lâmina própria) observou-se o desaparecimento total das substâncias Baker-positivas.

Figura 6

Fotomicrografia da camada superficial queratinizada do epitélio gengival (gengiva normal).

Teste de Baker mostrando fosfolipídios na camada queratinizada e nos citoplasmas de células da camada granulosa.

Aumento original: 10x45.

Figura 7

Fotomicrografia da superfície epitelial de gengiva inflamada.

Teste de Baker mostrando células da camada granulosa na superfície, contendo fosfolipídios no seu citoplasma.

Aumento original: 45x10

3.3 - Técnica Histofísica

Os resultados das medidas dos retardos óticos estão nos quadros I,II,III,IV e V. Os símbolos usados nestes quadros são:

- N = número da amostra
- C = ângulo de extinção do compensador
- C₁ = leitura angular na compensação
- d = ângulo real de compensação ($d=C-C_1$).
- R.O. = retardo ótico (medido em milimicrons)
- A = Antes (medida feita antes do tratamento por piridina)
- D = Depois (medida feita depois do tratamento por piridina)

3.3.1 - 1ª Série (Gengiva normal)

A 1ª série, constituída de 10 lâminas escolhidas ao acaso, de uma mesma gengiva clinicamente normal, também escolhida ao acaso, foi submetida às medidas do R.O. antes (A) e depois (D) do tratamento de remoção de lipídios. As medidas foram feitas somente na camada superficial, e os resultados são apresentados no quadro I.

*

QUADRO I

MEDIDAS DO RETARDO ÓTICO

1ª Série: Gengiva clinicamente normal:- (10 lâminas escolhidas ao acaso, de uma mesma gengiva também escolhida ao acaso).

Camada superficial

N		C	Cl	d	R.O.
1	A	45,0	39,5	5,5	9,0057
	D	45,0	42,0	3,0	4,9324
2	A	45,0	39,5	5,5	9,0057
	D	45,0	40,6	4,4	7,2197
3	A	45,0	35,9	9,1	16,1518
	D	45,0	42,0	3,0	4,9324
4	A	45,0	38,8	6,2	9,9743
	D	45,0	39,5	5,5	9,0057
5	A	45,0	37,7	7,3	11,8962
	D	45,0	39,0	6,0	9,8128
6	A	45,0	38,5	6,5	10,6200
	D	45,0	41,0	4,0	6,5886
7	A	45,0	40,0	5,0	8,1939
	D	45,0	40,9	4,1	7,7326
8	A	45,0	34,3	10,7	17,2223
	D	45,0	40,0	5,0	8,1939
9	A	45,0	38,4	6,6	10,7795
	D	45,0	41,4	3,6	6,0246
10	A	45,0	40,0	5,0	8,1939
	D	45,0	41,0	4,0	6,5886

Estas medidas, que estão no quadro I, foram submetidas a tratamento estatístico. A análise de variância apresentou o seguinte resultado:

CAUSAS DA VARIÂNCIA	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
Tratamento	1	80,2076	80,2076	12,58+
Resíduo	18	114,6914	6,3717	
Total	19	194,8990		

+ Conclusão: O resultado ($F= 12,58$) é altamente significativo, tendo probabilidade maior que 99% de ter sido obtido devido ao tratamento pela piridina.

3.3 - 2ª Série (Gengivas normais)

A 2ª série, constituída de 11 lâminas escolhidas ao acaso, de 11 gengivas clinicamente normais, também escolhidas ao acaso, foi submetida às medidas do R.O.. Em cada lâmina fez-se a medida do R.O. da camada superficial e dos espaços intercelulares, antes e após o tratamento de remoção de lipídios pela piridina. Obtiveram-se assim 4 grupos de medidas, que estão nos quadros II e III.

Símbolos usados na análise da variância

- G.L. = grau de liberdade.
- S.Q. = soma dos quadrados.
- Q.M. = quadrado médio
- F. = variância

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIACABA
BIBLIOTECA

QUADRO II
MEDIDAS DE RETARDO ÓTICO

2ª série: Gengivas clinicamente normais:- (11 lâmi-
nas diferentes escolhidas ao acaso, de 11 gengivas
também escolhidas ao acaso.)

Camada superficial

N		C	C1	d	R.O.
1	A	45,0	41,0	4,0	6,5886
	D	45,0	42,0	3,0	4,9324
2	A	45,0	37,8	7,2	11,4696
	D	45,0	39,4	5,6	9,0293
3	A	45,0	39,7	5,3	8,3741
	D	45,0	41,0	4,0	6,5886
4	A	45,0	37,3	7,7	13,2672
	D	45,0	40,0	5,0	8,1939
5	A	45,0	41,0	4,0	6,5886
	D	45,0	41,5	3,5	5,7489
6	A	45,0	41,0	4,0	6,5886
	D	45,0	41,4	3,6	6,0246
7	A	45,0	39,0	6,0	9,8128
	D	45,0	41,5	3,5	5,7489
8	A	45,0	41,2	3,8	5,8339
	D	45,0	42,0	3,0	4,9324
9	A	45,0	39,5	5,5	9,0057
	D	45,0	41,0	4,0	6,5886
10	A	45,0	39,0	6,0	9,8128
	D	45,0	42,0	3,0	4,9324
11	A	45,0	38,9	6,1	9,8364
	D	45,0	40,1	4,9	7,4906

QUADRO III
MEDIDAS DE RETARDO ÓTICO

2ª Série: Gengivas clinicamente normais:- (11 lâminas diferentes, escolhidas ao acaso, de 11 gengivas também escolhidas ao acaso.)

Espaços intercelulares

N		C	Cl	d	R.O.
1	A	45,0	42,5	2,5	4,1111
	D	45,0	42,5	2,5	4,1111
2	A	45,0	39,0	6,0	9,8128
	D	45,0	39,0	6,0	9,8128
3	A	45,0	42,0	3,0	4,9324
	D	45,0	42,0	3,0	4,9324
4	A	45,0	41,2	3,8	5,8339
	D	45,0	41,2	3,8	5,8339
5	A	45,0	41,0	4,0	6,5886
	D	45,0	41,6	3,4	5,5884
6	A	45,0	42,3	2,7	4,4368
	D	45,0	41,4	3,6	6,0246
7	A	45,0	41,4	3,6	6,0246
	D	45,0	42,0	3,0	4,9324
8	A	45,0	43,0	2,0	3,2898
	D	45,0	43,0	2,0	3,2898
9	A	45,0	41,8	3,2	5,2580
	D	45,0	42,4	2,6	4,2716
10	A	45,0	42,8	2,2	3,6816
	D	45,0	42,4	2,6	4,2716
11	A	45,0	40,3	4,7	7,7030
	D	45,0	40,5	4,5	7,3820

No quadro II, encontram-se as medidas de retardo ótico da camada superficial, antes e depois do tratamento. Estas medidas, foram submetidas à análise da variância, fornecendo os seguintes resultados:

Análise da Variância dos resultados do quadro II

CAUSAS DA VARIÂN.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
Tratamento	1	33,0066	33,0066	9,050+
Resíduo	20	72,9401	3,6470	
Total	21	105,9467		

+ Conclusão: O resultado é altamente significativo, tendo probabilidade maior que 99% de ter sido obtido devido ao tratamento.

No quadro III, ainda desse mesmo lote de gengivas, encontram-se as medidas de retardo ótico dos espaços intercelulares, antes e depois do tratamento por piridina. Submetidas à análise da variância, obteve-se o seguinte resultado:

Análise da Variância de resultados do quadro III

CAUSAS DA VARIÂN.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
Tratamento	1	0,0657	0,0657	0,0228+
Resíduo	20	57,5872	2,8793	
Total	21	57,6529		

+ Conclusão: O resultado não é significativo, isto é, a variação não tem probabilidade de ser devída ao tratamento de remoção dos lipídios pela piridina.

3.3.3 - 3ª Série (Gengiva Inflamada)

Nêste lote, constituído de 11 lâmi-
nas escolhidas ao acaso, de 11 gengivas clinicamen-
te inflamadas, também se fez a medida do R.O.,
Nesta série porém, foram feitas sòmente da camada su
perficial e dos espaços intercelulares sem remoção de
lipídios por piridina, pois que, o objetivo era exclu-
sivamente a determinação das diferenças com rela-
ção às gengivas normais. Os resultados das medidas de
R.O. da camada epitelial superficial estão apresenta
dos no quadro IV.

*

QUADRO IV

MEDIDAS DE RETARDO ÓTICO

3ª Série: Gengivas clinicamente inflamadas:- 11 lâminas escolhidas ao acaso, de 11 gengivas inflamadas também escolhidas ao acaso.)

Camada superficial

N	C	C1	d	R.O.
1	45,0	42,7	2,3	3,7873
2	45,0	39,9	5,1	8,3544
3	45,0	40,2	4,8	7,8682
4	45,0	39,0	6,0	9,8128
5	45,0	40,0	5,0	8,1939
6	45,0	42,0	3,0	4,9324
7	45,0	40,2	4,8	7,8682
8	45,0	41,0	4,0	6,5886
9	45,0	42,0	3,0	4,9324
10	45,0	43,0	2,0	3,2898
11	45,0	41,0	4,0	6,5886

Como nesta série fizeram-se as medidas do R.O. somente sem tratamento pela piridina, os resultados serão comparados com os resultados obtidos nas medidas feitas também na camada superficial da série de gengivas clinicamente normais (série 2, "Antes").

Análise da Variância dos resultados do quadro IV, em relação aos resultados do quadro II, Antes:

CAUSAS DA VARIÂN.	G.L;	S.Q.	Q.M.	F.
Inflamação	1	28,4939	28,4939	5,83 +
Resíduo	20	97,7320	4,8866	
Total	21	126,2259		

+ Conclusão: O resultado é significativo ao nível de 0,05, ou seja, tem 95% de probabilidade de que a variância seja devida ao processo inflamatório.

As medidas do retardo ótico dos espaços intercelulares, nesta série 3, constituída de gengivas clinicamente inflamadas, apresentaram os resultados do quadro V.

*

QUADRO V

MEDIDAS DE RETARDO ÓTICO

3ª Série: Gengivas clinicamente inflamadas:- 11 lâminas escolhidas ao acaso, de 11 gengivas inflamadas também escolhidas ao acaso.)

Espaços intercelulares

N	C	C1	d	R.O.
1	45,0	43,0	2,0	3,2898
2	45,0	41,5	3,5	3,7489
3	45,0	41,3	3,7	6,0746
4	45,0	40,5	4,5	7,3820
5	45,0	41,0	4,0	6,5886
6	45,0	41,1	3,9	6,4050
7	45,0	39,0	6,0	9,8128
8	45,0	42,5	2,5	4,1111
9	45,0	41,2	3,8	5,8339
10	45,0	42,8	2,2	3,6816
11	45,0	41,3	3,7	6,0746

O tratamento estatístico, foi feito comparando êstes resultados (quadro V) com aquêles obtidos nos espaços intercelulares da gengiva normal (quadro III, Antes). Fêz-se a análise da variância e se obteve o seguinte resultado.

Análise da variância dos resultados do quadro V em relação com os resultados do quadro III, Antes.

CAUSAS DA VARIÂN.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
Inflamação	1	0,5101	0,5101	0,1764 +
Resíduo	20	57,8324	2,8916	
Total	21	58,3425		

+ Conclusão: O resultado não tem significância, isto é, a variação não tem probabilidade de ter sido devida ao processo inflamatório.

*

8a

8b

8 - Fotomicrografia mostrando a birrefringência da camada superficial do epitélio.
Compensador usado: Brace-Köhler.

8a - Compensador em posição de extinção. Camada superficial a 45º do polarizador.

8b - Compensador girado para a obtenção da compensação da camada superficial.

Notar em 8a a birrefringência da camada superficial, estando o campo escuro. Em 8b, observa-se o contrário.

Houve pois, compensação da birrefringência da camada superficial.

4 - DISCUSSÃO

As técnicas histoquímicas empregadas no estudo de lipídios podem fornecer resultados altamente significativo, permitindo aos pesquisadores fazerem seguras conclusões. Cain, citado por PEARSE (1960 A) salienta o fato de que os lipídios são realmente menos difíceis de analisar histoquimicamente que carboidratos ou proteínas. Acredita que a falta de estudos histoquímicos de lipídios era devida a uma insegurança geral em relação às técnicas.

ENGSTRÖM e FINEANN (1958), ONCLEY (1961), HALE (1958), FLESCH e ESODA (1962), COON et alii (1963), PEARSE (1960 B), CANTAROW e SCHEPARTZ (1962) observaram que nos tecidos animais, os lipídios estão quase sempre combinados, formando complexos. HALE (1958), ENGSTRÖM e FINEANN (1958) ressaltam as dificuldades encontradas ao se estudar as propriedades dos lipídios, em virtude da probabilidade dessas moléculas se associarem com outros sistemas lipídicos mistos nos quais as propriedades dos componentes individuais alteram-se.

Por outro lado, HILLARP e OLIVECROMA (1946) mostraram que as células epiteliais de diver-

sos órgãos de ratos apresentavam birrefringência e que esta birrefringência provavelmente seria causada por lipídios orientados. Esta hipótese é amparada pelo fato de solventes de gordura fazerem desaparecer esta birrefringência.

Para atingir os objetivos propostos no início deste trabalho, procurou-se utilizar, além de técnicas histoquímicas, (Sudanofilia, Teste de Baker e Teste da extração por piridina), um método histofísico (medidas de R.O.). Acredita-se que os resultados de uma e de outra técnica se complementam, permitindo uma interpretação mais segura.

4.1 - Técnicas Histoquímicas

4.1.1 - Sudanofilia

O Sudan negro ("Sudan Black" B) é, segundo LISON (1960 B), o mais eficaz dos corantes de corpos graxos. Tem grande afinidade aos lipídios e possui uma coloração intensa.

Os resultados obtidos na presente pesquisa, pelo uso do Sudan negro, dentro da técnica preconizada para coloração de corpos graxos, mostraram a presença de material sudanófilo que se pode considerar como lipídio. Quando à distribuição topográfi

ca dêsses lipídios, observou-se que, desde a camada basal, as células epiteliais têm material lipídico intracitoplasmático, o qual, à medida que a observação se dirige para a superfície do epitélio, apresenta importantes modificações. Assim, notam-se acúmulos destas substâncias nas proximidades nucleares, em maiores condensações nas células espinhosas próximas da camada granulosa.

Nas regiões bem superficiais, queratinizadas, a presença de material lipídico constatou-se através de uma sudanofilia que se distribuía em lamelas estratificadas, como se houvesse uma "laminção" do material lipídico previamente existente nas células. A respeito destas modificações topográficas do material sudanófilo, pode-se levantar a seguinte hipótese: o material lipídico vem sendo sintetizado em íntima relação com as modificações morfológicas e funcionais das células epiteliais, culminando no processo de queratinização. Na camada superficial, queratinizada êstes lipídios são estruturados, fazendo corpo com o edifício macromolecular da zona queratinizada.

ZELICKSON (1961) estudando ao microscópio eletrônico o processo de queratinização em pele humana, observou que o padrão final da célula

cornificada consistia de filamentos, cimentados juntos por um material eletro-denso. Êste padrão, afirmou o autor, é similar àquele descrito para o cabelo e pêlo, no qual, um grupo de filamentos compactos bem orientados é visto no último estágio de queratinização. Afirmou ainda que o segundo componente importante era a matriz ou substância cementante. Observou que esta substância cementante era fortemente osmiofílica e por isso, provavelmente, contenha enxôfre. FLESCH e ESODA (1962) observaram, em pele humana, que os mucopolissacarídeos sofrem decomposição durante o processo de queratinização normal da epiderme, não ocorrendo aí de maneira livre, mas combinado com uma grande molécula, aparentemente um glicoproteolipídio. Os mesmos autores isolaram um material gorduroso firmemente ligado à trama queratinizada da epiderme humana. Notaram ser uma substância complexa, com funções aparentemente cementantes. Acreditaram que a invariável presença de lipídios em íntima combinação com a queratina é de fundamental importância para a dermatologia clínica. Como se pode compreender, tais autores mostraram bioquimicamente, de um lado a presença de um material gorduroso associado à queratina (da pele), ao mesmo tempo que apresentaram imagens electromicroscópicas de um material den

so, osmiofílico, que teria, segundo êles, uma função cementante.

Na presente pesquisa, mostrou-se topoquimicamente a presença de material gorduroso em íntima relação com a queratina.

Agora, a hipótese mais provável, e, pensa-se, a mais cabível, é aquela já apresentada nesta discussão (substâncias gordurosas participando do edifício macromolecular das zonas queratinizadas).

Poder-se-ia argumentar que na gengiva humana as condições de queratinização não são as mesmas encontradas na pele, material com que trabalharam os autores acima citados. Contudo convém lembrar que em gengiva de roedores, BOZZO e VALDRIGUI (1964) mostraram a positividade das mesmas reações com as mesmas características topoquímicas. Anteriormente ainda a êste trabalho, BOZZO (1963) observou na substância do interior de cistos gengivais, nos cortes corados pelo amarelo de Tiazol, uma fluorescência idêntica à da camada queratinizada da superfície epitelial gengival.

Tais observações vêm apoiar sobretudo as idéias do presente trabalho, uma vez que na mucosa gengival não há glândulas lipidogênicas que e-

ventualmente poderiam ser responsabilizadas pela presença dos lipídios. Êstes, na gengiva, provêm da atividade celular do próprio epitélio.

Ainda mais, TEN CATE (1963) estudando a distribuição da fosfatase ácida, esterase não específica e lipídios no epitélio oral, observou que os locais de atividade enzimica e lipídios pareciam coincidir. Acreditou que êstes achados eram indicadores da presença de lisosomas ou partículas semelhantes no epitélio oral.

Tais achados vêm também consubstanciar os resultados e idéias do presente trabalho.

Nos espaços intercelulares cabem as mesmas considerações quanto à validade das reações de coloração.

BRODY (1959 A) observou ao microscópio eletrônico, que na pele humana, o espaço intercelular, entre células granulares, transicionais e queratinizadas, continha material amorfo, no qual vesículas estavam dispersas. THONARD e SCHERP (1962) observaram que nos espaços intercelulares do epitélio gengival humano havia, além de mucopolissacarídeos ácidos, uma outra substância cementante desconhecida, não removida por polissacarases conhecidas.

Como argumentaram FLESCH e ESODA ...

(1962), as substâncias por êles detectadas, assim como aquelas detectadas por THONARD e SCHERP, os lipídios e outras substâncias formam uma grande molécula provavelmente um glicoproteolipídio.

A respeito das colorações intracitoplasmáticas resta interpretar o seu significado.

Tratar-se-ia de lipídios constituintes de organelas citoplasmáticas ou lipídios estruturais em fase de elaboração. LISON (1960 C), a respeito das propriedades do Sudan negro, afirmou que êste corante dá resultados positivos ao demonstrar as mitocôndrias e certos elementos do aparelho de Golgi onde outros corantes não o fazem suficientemente. ZELICKSON e HARTMANN (1962) estudando a mucosa oral humana, normal, observaram que o aparelho de Golgi é bem desenvolvido e localizado nos polos opostos do núcleo. As mitocôndrias são abundantes e como degeneram, provavelmente dão origem à vesículas.

Os resultados obtidos no presente trabalho mostraram nos polos nucleares uma condensação de substâncias fortemente coradas pelo Sudan, e que se acredita ser realmente o aparelho de Golgi. Aceita-se pois como certa, a presença de lipídios demonstrada neste trabalho, como parte de condrioma e principalmente aparelho de Golgi. Não se afasta con-

tudo, a idéia de que tal coloração denuncia a presença de lipídios estruturais em elaboração; pois só a presença do aparelho de Golgi exuberante e condrioma, como foram vistos, significam uma atividade intensa de síntese na célula.

Muita importância pois, tem a determinação dos tipos de corpos graxos sudanófilos, razão pela qual levou-se a efeito na presente pesquisa, o teste de Baker, cujos resultados serão discutidos em seguida.

4.1.2 - Teste de Baker e Extração por Piridina

O teste de Baker tem sido amplamente utilizado para demonstração de fosfolipídios. Seu significado e validade são confirmadas por Lison ... (1960 D), Lillie (1953 B), Cain (1947) e muitos outros.

Aceitando-se o que informam estas fontes bibliográficas, pode-se admitir a presença de fosfolipídios junto à superfície do epitélio gengival, queratinizado, bem como no citoplasma das células da camada granulosa onde se viu grande quantidade de grânulos Baker-positivos. O mesmo se diga, em relação às pérolas queratínicas e cistos gengivais.

Nas gengivas inflamadas, pôde-se cons

tatar uma grande irregularidade de distribuição dos fosfolipídios. Esta irregularidade revelaria distúrbios na sua síntese, vindo êste fator depôr a favor da hipótese de que haveria íntima relação entre a elaboração de queratina e a de lipídios, ou melhor, de fosfolipídios.

Este idéia merece séria consideração pois se fundamenta em fatos biológicos já bem confirmados de que a participação de fosfolipídios é indispensável para a estruturação de formações biológicas, como por exemplo, bainha de mielina, membranas celulares e mesmo componentes citoplasmáticos.

Segundo WEISS (1961) os lipídios na bainha de mielina estão ligados a proteínas, formando um complexo lipo-protéico. ADAMS e BAYLISS (1961) observaram que o tratamento de nervos periféricos não fixados, por ênzimos proteolíticos, levam à liberação de lipídios da mielina, provàvelmente como um resultado da ruptura do complexo entre lipídio e uma proteína digerível por tripsina. A hemateína-ácida mostrou que nos cortes de gengiva onde predominavam alterações exudativas-vasculares (gengivite-subaguda), as bainhas de mielina eram pouco nítidas, com aspecto esfumado, mostrando em seu redor substâncias Baker-positivas dispersas. Desde que na gengiva

normal e na gengivite crônica as bainhas de mielina eram nítidas e fortemente Baker-positivas, acredita-se que na gengiva inflamada, os fenômenos exudativos promovem a desintegração da bainha de mielina, liberando os lipídios.

Desde que, além de fosfolipídios, também nucleoproteínas se coram pela hemateína ácida, o teste de Baker possui uma operação de controle, que é o teste da extração por piridina. Esta operação permite distinguir entre substâncias lipídicas e não lipídicas coráveis pela hemateína.

Executou-se o tratamento por piridina, recomendado no teste e observou-se que na camada superficial do epitélio a remoção da substância Baker positiva foi bastante irregular. Desde a remoção total, até a persistência da positividade de toda camada superficial ao teste de Baker, toda uma gama de variações foi observada.

Estas variações dos resultados obtidos com a extração por piridina encontram amparo na afirmação de Pearse (1960 C): " In the case of Baker's hot pyridine extract the results on formalin-fixed (or Weak Bouin-fixed) tissues may also be confusing".

Continuando suas considerações, este

autor cita observações feitas no desenvolvimento da mielina em cérebro de coelho. Até o 11º dia post-natal, todo lipídio corado pela hemateína ácida ficava negativo com a extração por piridina. Após êste dia entretanto, havia um aumento na quantidade de resíduo corado pela hemateína na bainha de mielina.

BOZZO e VALDRIGHI (1964) observaram que a extração por piridina na camada queratinizada da gengiva de rato e de cobaia removia totalmente os lipídios corados pela hemateína.

Analisando os resultados obtidos no presente trabalho, pode-se estabelecer o seguinte:

A) No teste de Baker, observou-se de maneira evidente, a positividade da reação na camada epitelial superficial e bainhas de mielina.

B) A piridina removeu em alguns casos, toda a substância Baker-positiva e em outros casos, apenas parcialmente.

4.2 - Técnica Histofísica

Uma das proposições do presente trabalho é a verificação da interação dos lipídios no processo de queratinização. Tal objetivo seria alcançado através das medidas do retardo ótico das ca

madras mais profundas e na superfície queratinizada do epitélio gengival, antes e depois da remoção de lipídios pela piridina.

É fato conhecido que o retardo ótico em materiais birrefringentes é devido a uma orientação molecular. Em mitocôndrias, SJÖSTRAND (1961) observou que os lipídios (cêrca de 40% da mitôcondria) mostravam birrefringência positiva. Afirmou que esta birrefringência era devida à orientação molecular dos lipídios.

HILLARP e OLIVECRONA (1946) levantaram a hipótese da birrefringência de células epiteliais ser devida a lipídios orientados, desde que os solventes orgânicos faziam desaparecer esta birrefringência.

Analisando os resultados obtidos no presente trabalho, observa-se:

4.2.1 - Gengiva clinicamente normal (1ª Série)

Nesta série de gengivas, fazendo as medidas de retardo ótico da camada superficial do epitélio, antes e após o tratamento de remoção dos lipídios, observou-se grande variação nos resultados. A análise da variância demonstrou que o resultado obtido foi altamente significativo, e que há probabilidade maior que 99% de que a variação tenha sido devido

ao tratamento pela piridina. Viu-se que a camada superficial queratinizada do epitélio gengival é intensamente birrefringente. Sabe-se que a birrefringência de uma estrutura depende de um arranjo de suas moléculas, não ao acaso, mas sim de maneira ordenada. Ora, desde que o tratamento dos cortes por solventes de lipídios fêz variar significativamente a birrefringência da camada queratinizada, pode-se deduzir que êstes lipídios participam desta birrefringência, isto é, participam da estruturação molecular desta camada.

Implicado nesta afirmação está a comprovação da 1ª hipótese do estudo estrutural dos lipídios, ou seja, o retardo ótico após a remoção dos lipídios é diferente do retardo ótico antes da extração por piridina. Esta comprovação vem ainda ratificar os resultados obtidos pelas técnicas histoquímicas.

4.2.2 - Gengivas clinicamente normais (2ª Série)

Nesta série de gengivas, de 11 pacientes diferentes, porém tôdas diagnosticadas como clinicamente normais, foram feitas as medidas do retardo ótico na camada superficial e nos espaços intercelulares, antes e depois do tratamento por piridina.

Na camada superficial (quadro II), a análise da variância mostrou que o resultado obtido é altamente significativo, com 99% de probabilidade da variação ter sido obtida devido ao tratamento de extração dos lipídios. Estes resultados são concordes com aqueles obtidos na 1ª série, e os confirma. Mais uma vez então, realça-se o fato de que os lipídios são ordenados e participantes da birrefringência da camada queratinizada. Confirma-se mais uma vez a hipótese de que o material lipídico em questão, realmente faz parte do edifício macromolecular das zonas queratinizadas.

Nos espaços intercelulares, a variação encontrada foi insignificante não permitindo as mesmas considerações, o que não exclue, contudo a presença de lipídios. A interpretação desses resultados parece evidente, pois se a birrefringência do espaço intercelular depende do arranjo molecular dos seus componentes, e a remoção de um dos componentes (os lipídios) não fez variar significativamente esta birrefringência, é lógico afirmar-se que os lipídios aí existentes estão ligados a outras substâncias, formando provavelmente macromoléculas, mas não participando da sua estruturação.

*

4.2.3 - Gengivas Inflamadas (3ª série, 11 pacien tes diferentes).

Fizeram-se as medidas de R.O. da camada superficial e dos espaços intercelulares, sem se fazer o tratamento de remoção de lipídios. Consequentemente so se obtiveram as medidas "Antes". (Quadros IV eV).

Os resultados obtidos na camada superficial das gengivas clinicamente inflamadas (quadro IV) foram comparados com os resultados obtidos na camada superficial das gengivas clinicamente normais (quadro II, Antes). A análise da variância mostrou que o resultado é significativo ao nível de .. 0,05, ou seja, tem 95% de probabilidade, da variação ser devida ao processo inflamatório.

Isto significa que, na gengiva clinicamente inflamada, os lipídios da camada superficial não possuem a mesma ordenação molecular observada na gengiva normal. Esta variação poderia ser interpretada como uma alteração metabólica provocada pela inflamação, da qual resultaria uma alteração na síntese dos componentes macromoleculares da camada queratinizada.

Tanto a diminuição como o aspecto de de

sorganizado da camada superficial, são observáveis pelos testes histoquímicos, e confirmados pelo método histofísico. Comprova-se assim a segunda hipótese do estudo estrutural. Nos espaços intercelulares, os resultados obtidos na gengiva normal (quadro III, Antes) comparados com os obtidos na gengiva inflamada, (quadro V) mostraram variações.

A análise estatística revelou que a variância do R.O. dos espaços intercelulares das gengivas normais e inflamadas é insignificante, isto é, que o processo inflamatório não determinou uma variação significativa no retardo ótico desses espaços.

Fazendo então uma análise de todos os resultados obtidos com as medidas do retardo ótico, nota-se que:

1) Na camada superficial da gengiva clinicamente normal houve uma variação significativa da birrefringência, quando se fez a remoção de lipídios por piridina.

2) Nos espaços intercelulares a birrefringência não apresentou variações significativas, nem pela extração por piridina, nem pela presença do processo inflamatório.

3) Na camada superficial do epitélio gengival, o processo inflamatório fez variar significante

mente a birrefringência.

Cabe lembrar mais uma vez, que birrefringência significa ordenação molecular, ficando as sim confirmadas as duas hipóteses levantadas ao início dêste estudo histofísico dos lipídios na gengiva humana.

5 - CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos e fundamentados na interpretação dos mesmos à luz dos conhecimentos atuais, pôde-se concluir:

- 1) Na gengiva humana existem lipídios.
- 2) Êsses lipídios estão distribuídos na camada superficial queratinizada, espaços intercelulares, aparelho reticular de Golgi, bainhas de mielina, paredes de vasos e hemácias.
- 3) Na camada superficial queratinizada e na bainha de mielina existe uma predominância de fosfolipídios.
- 4) Na gengiva inflamada há uma significante diminuição da quantidade de lipídios na camada superficial, assim como uma desintegração da bainha de mielina com liberação de lipídios. Aparecem também algumas células histiocitárias carregadas de lipídios.
- 5) Na camada queratinizada da gengiva normal os lipídios possuem uma orientação molecular, participando da estruturação desta camada.
- 6) Na gengiva inflamada há uma variação significante da quantidade e estruturação dos lipídios

na camada superficial.

7) Nos espaços intercelulares, os lipídios estão ligados provavelmente a outras substâncias, talvez de natureza protéica.

8) A birrefringência dos espaços intercelulares não é alterada significativamente, nem pela remoção dos lipídios nem pelo processo inflamatório, isto é, os lipídios que aí existem não possuem orientação molecular.

*

6 - RESUMO

Empregando técnicas histoquímicas e método histofísico, o autor fez um estudo da presença, distribuição e estruturação dos lipídios na gengiva humana. Para êste estudo utilizou biópsias gengivais de pacientes do sexo masculino. Como fixadores foram usados: formol-cálcio, bicromato de potássio-bicloreto de mercúrio (Bi-Bi) e Bouin. As técnicas histoquímicas empregadas foram: teste de Baker conjugado com o teste de extração pela piridina, e coloração pelo Sudan negro.

Como método histofísico utilizou medidas do retardo ótico, obtidas antes e depois da remoção dos lipídios por piridina.

Modernamente tem sido realçada a participação dos lipídios, especialmente fosfolipídios, na estruturação de formações biologicamente importantes. No presente trabalho, o autor observou através de reações histoquímicas que na gengiva humana os lipídios estão distribuídos especialmente na camada superficial queratinizada, nos espaços intercelulares e nas bainhas de mielina. Observou ainda que nos casos de gengivite, especialmente naqueles onde pre-

dominam fenômenos exudativos-vasculares, havia uma acentuada diminuição dos lipídios na camada superficial.

Fazendo as medidas do retardo ótico antes e depois da remoção de lipídios por piridina, o autor determinou uma variação significativa dêsse retardo na camada superficial. Esta variação permitiu ao autor concluir que os lipídios existentes na camada superficial queratinizada participam da estruturação macromolecular dessa camada.

Comparando as medidas do retardo ótico obtidas nas gengivas normais e inflamadas, observou que o processo inflamatório determina uma variação significativa dêsse retardo na camada superficial.

Interpretou esta variação como uma alteração metabólica provocada pela inflamação e da qual resulta uma alteração na síntese dos componentes macromoleculares da camada queratinizada. Entre êsses componentes figuram os lipídios, os quais, no processo inflamatório estão muito diminuídos.

:::

RÉSUMÉ

En employant des techniques histochimiques et une méthode histophysique l'auteur a fait une étude de la présence, de la distribution et de la structure des lipides dans la gencive humaine.

Pour faire ce travail il a utilisé des biopsies gencivales de patients du sexemasculin. Comme fixateurs ont été utilisés: le formol-calcium, le bichromate de potassium - bichlorure de mercure - (Bi-Bi) et le Bouin.

Les techniques histochimiques employées ont été: le test de Baker conjugué avec les test d'extraction par la pyridine et la coloration par le noir Soudan.

Comme méthode histophysique il a utilisé les mesures du retard optique, obtenues avant et après de l'extraction des lipides par la pyridine.

Modernement la participation des lipides, spécialement des phospholipides dans la structure de formations importantes sur le point de vue biologique, a été mise en évidence. Dans ce travail, l'auteur a remarqué à travers de réactions histochimiques, que dans la gencive humaine les lipides sont distribués spécialement dans la couche superficielle

kératinisée, dans les espaces intercellulaires, et, dans la myéline. Il a remarqué encore que dans les cas de gencivite, spécialement dans ceux où prédominent des phénomènes exsudatif-vasculaires, il y avait une diminution accentuée des lipides dans la couche superficielle.

En mesurant le retard optique avant et après l'extraction des lipides par la pyridine, l'auteur a vérifié une variation significative de ce retard dans la couche superficielle.

Cette variation lui a permis de conclure que les lipides qui existent dans la couche superficielle kératinisée participent de la structure macromoléculaires de cette couche.

En faisant la comparaison des mesures du retard optique obtenues dans des gencives normales et dans des gencives inflammées, l'auteur a observé que le procédé inflammatoire détermine une variation de ce retard dans la couche superficielle.

Il a interprété cette variation comme une altération métabolique provoquée par l'inflammation de laquelle résulte une altération dans la synthèse des composants macromoléculaires de la couche kératinisée.

Parmi ces composants figurent les

lipides, qui sont très diminués dans le procédé inflammatoire

SUMMARY

Using histochemistry techniques and histophysical method, the author made a study of the presence, distribution and structuration of lipids in human gingiva. For this study, he used gingival biopsy of male patients. Formol calcium, bichromate of potassium-bichloride of mercury (Bi-Bi) and Bouin, were used as fixatives. The histochemistry techniques used were: Baker test together with the Pyridine extraction test and Sudan Black B staining.

As histophysical method, he used means of optical retardation obtained before and after removal of the lipids by Pyridine.

Presently the participation of lipids, especially phospholipids, in the structuration of formations biologically important has been stressed. In the present work the author observed, through histochemical reactions that in human gingiva the lipids are distributed especially in the Keratinized superficial layer, in the intercellular spaces and in the myelin sheath. He also observed that in cases of gengivitis, especially where exudative vascular phenomena predominate, there was a considerable decrease of lipids in the superficial layer.

Measuring the optical retardation before and after removal of lipids by Pyridine, the author determined a significant variation of this retardation in the superficial layer. This variation permitted the author to conclude that the lipids existing in the keratinized superficial layer take part in the macromolecular structuration of this layer.

Comparing the measures of the optical retardation obtained in the normal and inflamed gingiva, he observed that the inflammatory process establishes a significant variation of this retardation.

He interpreted this variation as a metabolic alteration caused by the inflammation and from which results an alteration in the synthesis of the macromolecular components of the Keratinized layer. Among these components figure the lipid which are very reduced in the inflammatory process.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - ADAMS, C.W.M. and BAYLISS, O.B. - The release of protein, lipid and polysaccharide components of the arterial elastica by proteolytic enzymes and lipid solvents. J. Histochem. Cytochem., Baltimore, 10 (2) 222-226 March, 1962.
- 2 - _____ - Histochemistry of Myelin. III Peripheral nerve cathepsin. J. Histochem. Cytochem., Baltimore, 9 (5) 473-476, Sept. ... 1961.
- 3 - BOZZO, L. - Histologia do Cisto Gengival - R. Biol. Oral, Piracicaba, 1 : 35-43, 1963.
- 4 - _____ e VALDRIGHI, L. - Estudo histoquímico de lipídios em gengiva de rato e cobaia. Rev. Biol. Oral, Piracicaba, (2):21-30, 1964.
- 5 - BRODY, I. (A) - An ultrastructural study on the role of the Keratohyalin granules in the Keratinization Process. J. Ultrastruct. Res., New York, - London, 3 : 84-104, 1959.

- 6 - _____ (B) - The Keratinization of epidermal cells of normal guinea pig skin as revealed by electron microscopy. J. Ultrastruct. Res. New York - London, 2 : 482-511, 1959.
- 7 - CABRINI, R.L. and CARRANZA, A.F. Jr. - Histochemical distribution of Acid Phosphatase in Human Gingiva. J. Periodont., Birmingham 29 (1) 34-37, Jan. 1958.
- 8 - CAIN, A.J. - An information of Baker'acid hema_utein test for phospholipds. Quart. J. Micr. Sci., 88 : 467-468, 1947.
- 9 - CHEVREMONT, M. - Cytologie et Histologie - Ed. Desoer - Liege - Belgium - 1956, p. 314.
- 10 - CHARLES , A. - An electron microscope study of cornification in the human skin. J. Invest. Derm., Baltimore, 33, 65-74, 1959.
- 11 - CANTAROW, A. and SCHEPARTZ, B. - Biochemistry 3rd Edition W.B. Saunders Cy-Philadelphia - London, 1962, pg. 31.
- 12 - COON, W.M. et alii - Free fatty acids of the skin surface and abnormal Keratinization. J. Invest. Derm., Baltimore, 41 : 259;264, 1963.

- 13 - ENGSTRÖM, A. and FINEANN, J.B. - Biological Ultrastructure - Academic Press Inc. - New York , 1958, p. 208.
- 14 - ENGEL, M.B. et alii - The pathogenesis of desquamative gingivitis: a disturbance of the connective tissue ground substance. J. dent. Res., Baltimore, 29 (4): 410-418, 1950.
- 15 - FLESCH, P. and ESODA, E.C.J. - Isolation of a glycoproteolipid from human horny layer. J. invest. Dermat., Baltimore, 39 (5): 409-415, 1962.
- 16 - FLORKIN, M. - Introduction Biochimique a la Médecine. Editions Desoer-Liége. Belgium, 1959 p. 220.
- 17 - GIBBONS, J. R. - Early changes in Migrating Oral epithelium. J. dent. Res., Baltimore, (42) (1): 7, 1963.
- 18 - GERSTEIN, W. - The phospholipids of Normal and Psoriatic Skin. J. invest. Derm., Baltimore 40 , 105-109, 1963.
- 19 - HILLARP, N.A. e OLIVECRONA, H. - Structural proteins and oriented lipoids in the cytoplasm of secreting and resorbing epithelial cells. Acta Anatomica, 2 (2): 119-141, 1946.

- 20 - HALE, A.J. - The interference microscope in biological research. E. & S Livingstone Ltd. Edinburg and London - 1958, p.83.
- 21 - LISON, L. (A) - Histochemie et Cytochimie Animales, Vol. II - 3^a Ed. Gauthier-Villars Ed. Paris - 1960, pg. 449.
- 22 - _____ (B) - idem - pg. 478.
- 23 - _____ (C) - idem - pg. 479.
- 24 - _____ (D) - idem - pg. 521.
- 25 - LILLIE, R.D. (A) - Histopathologic technic and practical histochemistry - Mc Graw - Hill Book Cy. New York, Toronto - London, 1954.
- 26 - _____ (B) - idem - pg. 323.
- 27 - MC HUGH, W.D. - The Keratinization of Gingival Epithelium . J. Periodont., Birmin-ghan, 35 (4), July-Aug., 338-348, 1964.
- 28 - MATOLTSY, A.G. and MATOLTSY, M. - A study of morphological properties of Keratohyalin granules, J. invest. Derm., Baltimore 38 , 237-247, 1962.

- 29 - ONCLEY, J.L. - Biophysical Science - Study Program 3rd ed. John Wiley & Sons Inc. New York, 1961, pg. 48.
- 30 - PEARSE, A.G.E. (A) - Histochemistry Theoretical and Applied. J. & A. Churchill, Ltd. London, 1960, p. 294.
- 31 - _____ (B) - idem, p. 289.
- 32 - _____ (C) - idem, p. 298.
- 33 - PRZELECKA, A. et alii - Cytochemical localization of phospholipids and of some hydrolases in the oocytes of *Rana temporaria*. Folia Morphologia, XIII (XXI), 1962, 3.
- 34 - ROTHMAN, S. - Physiology and Biochemistry of the Skin. The University of Chicago Press. Chicago, 1954, p. 488.
- 35 - SWANBECK, G. - On the Keratin fibrils of the skin. An. X. ray small angle scattering study of the horny layer. J. Ultrastruct. Res. New York, London, 3, 51-57, 1959.
- 36 - SJÖSTRAND, F.S. - Fine structure of Cytoplasm: The organization of Membranous layer - in Oncley, J.L. Biophysical Science - A study PROGRAM

progam. - 3rd Edition. John Wiley & Sons. Inc. New York, 1961, p. 304.

- 37 - THONARD, J.C. and SCHERP, H.W. - Histochemical Demonstration of acid mucopolysaccharides in human gingival epithelial intercelular spaces. Arch. Oral Biol. Oxford, 7 (2): 125-138, mar. april, 1962.
- 38 - TEN CATE, A.R. - The distribution of acid phosphatase, non specific esterase and lipid in oral epithelia in man and the macaque monkey, Arch. oral Biol. Oxford, 8 (6) : 747-753, 1963.
- 39 - VALERI, V. - Informação pessoal (1964).
- 40 - ZELICKSON, A.S. - Normal human Keratinization Process as demonstrated by electron microscopy. J. invest. Derm., Baltimore, 37 359-379, 1961.
- 41 - ZELICKSON, A.S. e HARTMANN, J.F. - An electron microscope study of normal human non keratinizing oral mucosa. J. invest. Derm., Baltimore, 38, 99-107, 1962.

- 42 - WEINMANN, J. - The queratinization of the human oral mucosa. - J. dent. Res., Baltimore, 19 (1): 57-71, 1940.
- 43 - _____ and MEYER, J. - Types of Keratinization in Human Gingiva. - J. invest. Derm. Baltimore, 32 (2): 87-94, fev. 1959.
- 44 - WEISS, P. - "Interactions between cells" in Oncley, J.L. Biophysical Science - A study program. 3rd Edition - John Wiley & Sons, Inc. New York, 1961, p. 449.

**

*

Impresso na Faculdade de Farmácia
e Odontologia de Piracicaba
1965