

LUIZ VALDRIGHI
Cirurgião Dentista

ESTUDO HISTOQUÍMICO E ESTRUTURAL DOS MUCOPOLISSACARÍDEOS ÁCIDOS NAS GENGIVITES EXSUDATIVO-VASCULARES E INFILTRATIVAS

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade de Campinas, para obtenção do grau de Doutor em Ciências (Patologia Oral)

PIRACICABA
1968

À memória de minha mãe

À minha espôsa

e aos meus filhos

Ao Professor Doutor Benedicto de Campos Vidal, Professor da Cadeira de Patologia desta Faculdade, orientador desta tese, que pelo seu trabalho, entusiasmo e dedicação nos tem sido um exemplo, o nosso mais sincero reconhecimento e gratidão.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Zeferino Vaz, Magnífico Reitor da Universidade de Campinas, que com seu tirocínio e inteligência tem imprimido novas diretrizes ao Ensino Superior.

Ao Professor Doutor Carlos Henrique Robertson Liberalli, Diretor Desta Faculdade, que com sua cultura e dinamismo conseguiu, em tão pouco tempo, colocar esta Casa de Ensino e Pesquisa na posição de destaque que ocupa e oferecer condições de trabalho aos que nela militam.

Ao Doutor Lourenço Bozzo e aos Instrutores Mario Roberto Vizioli e Oswaldo Walder Jr., colegas da Cadeira de Patologia, pelo incentivo e colaboração que nos deram.

Aos integrantes do Grupo de Medicina Oral desta Faculdade, que nos franquearam a clínica de Periodontia e nos auxiliaram na colheita do material.

Aos Srs. Antonio Kerches de Campos e Adilson Pinto Pereira pela colaboração na parte técnica de laboratório; à Sra. Myriam Soares de Arruda e à Srta. Linda Sarkis pela colaboração na parte de bibliografia e datilografia.

Agradecemos também, a todos aqueles que, de uma maneira ou de outra, emprestaram sua colaboração na elaboração deste trabalho.

Í N D I C E

	pg.
INTRODUÇÃO	7
I.1 - OBJETIVOS	15
MATERIAL E MÉTODOS	
II.1 - MATERIAL	17
II.2 - MÉTODOS	18
II.2.1 - Fixação	18
II.2.2 - Inclusão e secções	18
II.2.3 - Estudos morfológicos (métodos)	18
II.2.3.1 - Tricrômico de Mallory	18
II.2.3.2 - Fluorescência pela Corifos- fina	18
II.2.3.3 - Impregnação pela prata	19
II.2.4 - Estudos histoquímicos (métodos)	
II.2.4.1 - Basofilia metacromática	
(Azul de Toluidina)	19
II.2.4.2 - Azul de Alcian (pH 2,5) ...	20
II.2.4.3 - Azul de Alcian (pH 1,0) ...	20
II.2.4.4 - Fluorescência pela Corifos- fina	20
II.2.4.5 - Tratamento pela hialuronida se Testicular	21
II.2.4.6 - Tratamento pela sialidase .	21
II.2.4.7 - Reações de bloqueio (metila ção, saponificação e hidró- lise ácida)	22
II.2.4.8 - Reação do PAS (ácido periódico-reativo de Schiff) ...	22
II.2.4.9 - Tratamento pela amilase sa- livar	23
II.2.4.10 - Acidofilia total (radicais básicos totais)	23
II.2.4.11 - Desaminação pelo ácido ní- troso	23

II.2.4.12 - Determinação do ponto iso- -elétrico aparente	24
II.2.5.- Estudos histofísicos (métodos)	
II.2.5.1 - Dicroísmo	25
II.2.5.2 - Birrefringência	25

RESULTADOS

III.1 - Estudos morfológicos	26
III.2 - Estudos histoquímicos	
III.2.1 - Generalidades	30
III.2.2 - Basofilia metacromática e Azul de Al- cian	31
III.2.3 - Digestões enzimáticas e reações de blo- queio	34
III.2.4 - Reação do PAS e coloração pelo Oran- ge G	34
III.2.5 - Fluorescência pela corifosfina	34
III.2.6 - Determinação do ponto iso-elétrico aparente	35
III.3 - Estudos histofísicos	
III.3.1 - Dicroísmo	36
III.3.2 - Birrefringência	37

DISCUSSÃO

IV.1 - Morfologia	42
IV.2 - Histoquímica	46
IV.2.1 - Os mucopolissacarídeos ácidos e o processo inflamatório	54
IV.2.2 - Fluorescência pela corifosfina	59
IV.2.3 - O ponto iso-elétrico aparente	59
IV.3 - Histofísica	
IV.3.1 - Dicroísmo	60
IV.3.2 - Birrefringência	63

CONCLUSÕES	65
------------------	----

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
----------------------------------	----

DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA	80
--------------------------------	----

I - INTRODUÇÃO

O processo inflamatório, quando se instala no tecido conjuntivo, provoca uma série de alterações estruturais e bioquímicas que há muito vêm sendo estudadas.

A regulação e controle do processo inflamatório dependem, segundo LETTERER, citado por HEILMEYER e KAHLER (1964), de um complexo estrutural, formado pela substância fundamental do tecido conjuntivo, suas células e os produtos de diferenciação para plasmáticas, bem como pelas estruturas nervosas e pelo setor terminal da circulação, que se encontram no interior do tecido conjuntivo.

É sabido que, em focos inflamatórios, tomam parte numerosos processos químicos. Segundo DALAUNAY e BAZIN (1963), "... tais processos são, ao mesmo tempo, causa e efeito de transformações de toda natureza, que ocorrem nos tecidos atingidos. Estes processos químicos se traduzem, de um lado, pelas variações que sofrem os constituintes normais da trama conjuntiva e, de outro, pelo aparecimento de novos constituintes que tomam parte ativa no processo inflamatório em desenvolvimento, podendo chegar ao local através do plasma sanguíneo, ou através de leucócitos. Finalmente, algumas substâncias, ainda, são produtos da atividade das células conjuntivas".

O fenômeno inflamatório, devido à sua importância e complexidade, tem sido estudado sob muitos pontos de vista. Alguns autores fazem estudos de âmbito geral, sem detalhar as suas diversas fases de desenvolvimento, enquanto outros têm a preocupação de focalizar as diferentes fases evolutivas do processo inflamatório que, em conjunto, formam o processo geral. Assim, HEILMEYER e KAHLER (1964), dividem o pro

cesso inflamatório em quatro fases: vascular, exsudativa, infiltrativa e proliferativa. Essas fases significam, sob um critério cronológico, o início, a evolução e o fim da inflamação.

É importante ressaltar que nem sempre é fácil empreender o estudo, em separado, de cada uma das fases do processo inflamatório. Na maioria das publicações que relacionam as modificações dos mucopolissacarídeos ácidos, consequentes às modificações metabólicas e estruturais dos tecidos inflamados, não houve a preocupação de focalizar as diversas fases evolutivas do fenômeno inflamatório.

Na gengiva, provavelmente, por causa das peculiaridades do agente flogógeno e da sua atuação por tempo prolongado, cada uma das fases do processo inflamatório, quase sempre, tem uma duração bastante longa. Baseados nestes fatos, VALDRIGHI e col. (1966) classificam as alterações gengivais de natureza inflamatória em agudas (exsudativo-vasculares), sub-agudas (infiltrativas) e crônicas (proliferativas); êsse trabalho, sob o ponto de vista histopatológico, relaciona-se com o critério de classificação adotado por RIBBERT e HAMPERL (1956).

Na fase exsudativo-vascular ocorrem transformações intimamente relacionadas com modificações do metabolismo local, resultado principalmente da ação de uma série de processos enzimicos (proteases, peptidases, lipases, polissacaridasas, etc.) originados no próprio local inflamado (HOUCK & JACOB-1961 a e b, VIDAL & BENATTI-1963, FULLMER-1966 e FULLMER & GIBSON-1966). Êstes ênzimos promovem a lise dos componentes normais do tecido afetado, que gradativamente vão sendo substituídos pelo exsudato inflamatório e por células plasmáticas, adquirindo, então, o aspecto que caracteriza a fase exsudativo-vascular.

O mecanismo pelo qual são desencadeados todos êstes fenômenos é muito complexo, envolvendo uma série de alterações fisiológicas, com a participação de inúmeras substâncias mediadoras e enzimicas, cujo estudo, aprofundado, foge ao escôpo dêste trabalho.

A fase infiltrativa, que vem a seguir, é intermediária entre as fases exsudativo-vascular, onde predominam os fenômenos destrutivos, e a fase proliferativa, onde há predominância dos fenômenos produtivos. A fase infiltrativa se caracteriza por uma atenuação dos fenômenos vasculares, edema moderado e, especialmente, pela presença predominante do chamado infiltrado linfo-plasmocitário. Tomam lugar nela, ainda, os primeiros indícios do fenômeno proliferativo.

Na literatura encontram-se diversos trabalhos de âmbito geral, que estudam o comportamento dos mucopolissacarídeos ácidos no processo inflamatório.

ALBERTINI (1961), realizando estudos sobre as "doenças do colágeno", constata que as alterações dêste começam com uma despolimerização da substância fundamental.

Em um estudo experimental, com transplante de fibrina homóloga intraperitoneal em ratos, VIKHERT e col. (1962) observam que, do segundo ao quarto dia após a transplantação, inicia-se uma intensa proliferação de fibroblastos, vasos, fibras de reticulina e fibras colágenas. Quando estas preparações eram coradas com azul de toluidina e azul de metileno, exibiam uma metacromasia na zona de proliferação celular, como sinal de acúmulo de carboidratos ácidos altamente polimerizados.

VIDAL (1963a), estudando histoquimicamente mais de uma centena de granulomas dentários,

detecta, entre outras substâncias, os mucopolissacarídeos ácidos, notadamente nas zonas de calcificação distrófica, nos mastócitos e junto aos feixes de colágeno.

Ao efetuar um estudo histoquímico em material de biópsias de ratos, coelhos e camundongos, CELLARIUS (1963) conclui pela inexistência de mucopolissacarídeos nos tecidos necróticos ou em decomposição purulenta.

KASABYAN (1964), estudando histoquimicamente os nódulos tuberculosos e focos exsudativos, verifica que o conteúdo em glicogênio e mucopolissacarídeos ácidos variava com o caráter da reação biológica e com o tipo de alterações morfológicas produzidas. Tanto é assim que, nas áreas de transformações fibrosas, aparecia um acúmulo de mucopolissacarídeos ácidos, enquanto que nos focos de exsudação havia muito pouca quantidade destas substâncias e nos locais de necrose estas desapareciam completamente.

DELAUNAY e BAZIN (1963), fazendo um relato dos resultados de pesquisas histoquímicas de mucopolissacarídeos em lesões cutâneas, provocadas em vários animais de laboratório, chegam às seguintes conclusões:

a) Nos tecidos inflamados, além dos mucopolissacarídeos ácidos, existem mucopolissacarídeos neutros PAS-positivos, que aparecem durante a proliferação fibroblástica.

b) Nas incisões praticadas na pele do dorso de ratos, as reações para mucopolissacarídeos ácidos atingem o seu máximo de intensidade do quarto ao sétimo dia. DUNPHY & UDUPA (1955) e BALAZS & HOLMGREN (1950), medindo a quantidade de azul de toluidina fixada sobre os mucopolissacarídeos ácidos dessas lesões, verificam que a quantidade en-

contrada do sétimo ao nono dia, após a incisão, ultrapassava de duas a três vezes aquela detectada no primeiro dia.

c) A partir do nono dia de evolução, a taxa de mucopolissacarídeos ácidos diminuía, progressivamente, até voltar ao nível normal.

HUDACK e col. (1949) constatam que, na zona de fratura do fêmur do coelho, aparecia uma substância Hale-positiva, resistente à hialuronidase. Essa substância atingia a sua mais alta concentração do sétimo ao décimo dia após o traumatismo. Esta concentração decrescia à medida que iam sendo elaboradas as fibras de colágeno.

Submetendo tendões de cobaias ao tratamento pela hialuronidase testicular, JACKSON (1953) verifica que o enzimo produzia uma redução na estabilidade dos mesmos. Esta diminuição podia ser notada por um aumento da solubilidade e intumescência das fibras de colágeno. Com base nestas evidências, concluiu que os mucopolissacarídeos desempenham um importante papel na estabilidade das fibras colágenas do tecido conjuntivo.

DUNPHY e UDUPA (1955), estudando histologicamente o processo de cura, discutem a origem e a participação da substância fundamental na formação das fibras colágenas. Eles concluem afirmando que qualquer que seja a origem da substância fundamental, seja de mastócitos ou dos fibroblastos, os mucopolissacarídeos ácidos sulfatados, nela contidos, formam um ambiente para a conversão do protocólágeno em colágeno.

HOUCK e JACOB (1961 a e b), em estudo experimental em ratos, demonstram que há uma diminuição de colágeno solúvel e insolúvel, tanto no local como à distância do foco inflamatório. Essa diminuição foi atribuída a uma ação enzimica colagenolítica.

HOUCK e col. (1962) verificam que a

resposta química da derme, no local de inflamação e de necrose, se caracteriza por uma diminuição de mucopolissacarídeos ácidos e de colágeno insolúvel, e por um acúmulo de glicoproteína endogenamente sintetizada, enquanto que no processo reparativo, parece ocorrer exatamente o fenômeno inverso.

GRIES e LINDNER (1963), efetuando um estudo da influência do extrato inflamatório sobre a degradação do colágeno, concluíram que este transforma o colágeno maduro insolúvel em colágeno solúvel, tornando-o, desta forma, mais suscetível à ação das proteases.

DELAUNAY e BAZIN (1963), depois de fazerem uma longa exposição dos trabalhos relacionados com o estudo bioquímico dos mucopolissacarídeos nos focos inflamatórios, tiraram, em síntese, as seguintes conclusões:

a) A taxa de mucopolissacarídeos é mais elevada nos tecidos inflamados do que nos tecidos sãos. Esta taxa aumenta rapidamente no início da proliferação fibroblástica, podendo atingir valores que são, de três a quatro vezes, superiores aos valores normais.

b) Entre os mucopolissacarídeos ácidos, os não sulfatados (ácido hialurônico) são mais abundantes que os sulfatos (condroitin sulfúrico).

c) A rapidez com que a taxa de mucopolissacarídeos aumenta, parece estar ligada ao tipo de inflamação em questão. Em todos os casos, porém, a taxa máxima parece ser atingida quando começam a se multiplicar ativamente as fibras de reticulina e de colágeno.

d) Posteriormente, a taxa diminui progressivamente e proporcionalmente à formação das fibras de colágeno.

ENQUIST e ADAMSONS (1965), após estudarem a síntese e a lise do colágeno nos processos de reparação dos tecidos, em diversas condições experimentais, concluem e advertem que, nos distúrbios dêstes, a causa tanto poderá ser devida a uma síntese diminuida, como a uma lise aumentada de colágeno.

VIDAL (1964b), empregando técnicas histoquímicas e histofísicas no estudo de tendões de cobaias, demonstra, entre outras coisas, que os mucopolissacarídeos ácidos podem apresentar, em certas condições, desarranjos em sua orientação macromolecular. Ainda no mesmo trabalho, o autor adverte que "...o em prêgo dêsses métodos de pesquisa (dicróísmo e birrefringência) abre amplas perspectivas no campo da Patologia; pois, graças a êles, poder-se-ão observar desarranjos moleculares de mucopolissacarídeos ácidos em cortes histológicos comuns, e que, devidamente interpretados, poderão esclarecer a patogenia de processos mórbidos do tecido conjuntivo".

Diversos autôres, ainda, preocuparam-se em estudar os mucopolissacarídeos nos processos inflamatórios gengivais.

Para GOLDMAN (1952) a inflamação na gengiva é, do ponto de vista histopatológico, associada à uma desintegração e perda de identidade das fibras colágenas. Por outro lado, JACKSON (1957), acredita, que, no processo inflamatório gengival, o desaparecimento das fibras de colágeno histológicamente visualizáveis, pode indicar não apenas um aumento na velocidade de destruição destas, mas, ser devido também, a um impedimento da síntese ou da organização dos precursores de colágeno solúvel, sendo que as fibras de colágeno insolúvel não chegam a ser formadas.

FASSEKE e MORGENROTH (1958) fazem um estudo histoquímico comparativo da gengiva normal e a "crônicamente" inflamada (periodontite). Como resulta

do verificam, entre outras coisas, que na lâmina própria poderá ocorrer uma despolimerização das mucoproteínas e, em consequência, a liberação dos mucopolissacarídeos ácidos, especialmente ácido hialurônico e condroitin sulfúrico.

MORGAN (1965) observa que a liberação ou acúmulo de certas substâncias, entre as quais mucopolissacarídeos ácidos, podem acarretar alterações estruturais das fibras de colágeno durante o processo inflamatório. Afirma, ainda, que essa liberação e acúmulo podem ocorrer simultaneamente, ou uma pode predominar na inflamação aguda e outro na crônica.

TURESKY e col. (1951) relatam, como resultado, das alterações ocorridas nas gengivites crônicas, uma diminuição da substância fundamental e de glicogênio, ao lado de um acúmulo de fosfatase no tecido conjuntivo, além de uma tendência para a desintegração da membrana basal.

ENGEL (1953), fazendo um estudo da variação da quantidade de mucoproteínas solúveis em água, em estados gengivais inflamatórios, verifica um aumento acentuado dessa substância, quando comparada aos tecidos normais. Essa variação foi atribuída a uma despolimerização enzimica, ou a uma alteração na síntese da substância fundamental do tecido conjuntivo.

SCHULTZ-HAUDT (1957) mostra, bioquimicamente, que a gengiva humana é consideravelmente mais rica em mucopolissacarídeos ácidos do que a pele; e que a gengiva inflamada contém menos mucopolissacarídeos que a gengiva normal.

STAHL e col. (1958) encontram na doença periodontal crônica um aumento da visualização dos mucopolissacarídeos associado a um aumento das fibras de reticulina.

QUINTARELLI (1960), efetuando um estudo

histoquímico de mucopolissacarídeos ácidos no tecido gengival, verifica que êstes existem em quantidade três vêzes maior na gengiva inflamada, comparativamente à gengiva normal. A mais alta concentração dessas substâncias é encontrada junto ao osso alveolar, nos mastócitos e nas áreas da substância fundamental infiltrada por leucócitos.

Em estudo histoquímico de gengivas inflamadas, TOTO e col. (1964) encontram uma diminuição dos mucopolissacarídeos ácidos e neutros nas áreas da substância fundamental, infiltradas por células plasmáticas.

FUCHS e CIECIURA (1967), realizando um estudo morfológico e histoquímico da gengiva humana, encontraram uma grande quantidade de mucopolissacarídeos ácidos nos casos onde eram intensos os fenômenos de fibrogênese, enquanto que quantidades mínimas dessas substâncias foram encontradas nos locais infiltrados por linfócitos e por "pequenas células redondas".

Da análise da literatura, depreende-se que, na maioria dos casos, os autores não situaram claramente a fase do processo inflamatório em que tais pesquisas foram realizadas. Por outro lado, levando-se em conta que nas diferentes fases do processo inflamatório, as características histopatológicas são diferentes, pode-se supôr que os processos bioquímicos também o sejam; daí a razão desta pesquisa.

I.1 - OBJETIVOS

É objetivo dêste trabalho estudar as variações quantitativas e qualitativas e ainda os possíveis desarranjos na orientação molecular que sofrem os mucopolissacarídeos ácidos, quando se instalam na gengiva, predominantemente, os fenômenos inflamatórios exsudativo-vasculares e/ou infiltrativos.

As alterações destas substâncias serão es
tudadas especialmente:

- a) na substância fundamental;
- b) junto aos feixes de colágeno;
- c) junto às paredes vasculares.

Procurar-se-á, também, relacionar a esta-
bilidade do colágeno com as transformações dos mucopo-
lissacarídeos ácidos.

II - MATERIAL E MÉTODOS

II.1 - MATERIAL

Colheram-se através de biópsias, 31 fragmentos de gengiva de pacientes da Clínica Odontológica da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, os quais eram portadores de doença gengival de natureza inflamatória, que pelos seus aspectos clínicos, apresentava presumivelmente o caráter exsudativo-vascular ou infiltrativo (VALDRIGHI e col., 1966). A biópsia era orientada no sentido de apanhar a gengiva marginal e parte da gengiva inserida. Após o exame histopatológico foram selecionadas, dêsse total, 26 gengivas que realmente apresentavam predominância de fenômenos inflamatórios exsudativo-vasculares ou infiltrativos. Essas 26 gengivas e mais 3 casos de gengivas normais, que serviram como padrão, constituíram o material para esta pesquisa.

Aparelhamento:

Para o corte das peças utilizou-se o microtomo "JUNG AG".

Os exames microscópicos em luz transmitida comum foram feitos ao microscópio "E. LEITZ ORTHOLUX".

Para o exame de fluorescência utilizou-se o fotomicroscópio "ZEISS POL", com filtro de excitação BG 12/4 e filtro de barreira 53.

O fotomicroscópio "ZEISS POL" foi também usado para os estudos de dicroísmo e de birrefringência.

Para as determinações de pH, lançamos mão do potenciômetro "METROHM E 350".

O ponto isoelétrico aparente da gengiva normal e inflamada foi obtido através do microscópio "E. LEITZ ORTHOLUX", combinado com um fotômetro "REMIPHOT D 959 REICHERT" e uma lâmpada de sódio, que serviu como fonte de luz monocromática.

II.2 - MÉTODOS

II.2.1 - Fixação:- Os fragmentos gengivais, após a biópsia, eram lavados em sôro fisiológico e em seguida, cada um deles foi dividido em 2 partes: uma delas era fixada em formol à 10% ou formol-salino (formalina a 10% em solução de cloreto de sódio a 0,9%), durante 24 horas; a outra parte era fixada em solução de Newcomer (SAUNDERS, 1964). Em todos os casos, os primeiros momentos de fixação foram realizados em câmara de vácuo.

II.2.2 - Inclusão e Seções:- Após fixados, os fragmentos gengivais foram incluídos em parafina pelas técnicas histológicas usuais e, em seguida, obtidos cortes com a espessura de 5 microns.

II.2.3 - Estudos Morfológicos:- Para os estudos morfológicos gerais utilizaram-se cortes corados pela hematoxilina-eosina, tricrômico de Mallory, corifosfina (fluorescência) e impregnados pela prata.

II.2.3.1 - Tricrômico de Mallory (CELESTINO DA COSTA, 1943).

a) Desparafinação e hidratação

b) Coloração dos cortes com solução de fucsina ácida a 0,5%, por 5 minutos.

c) Passagem direta para a seguinte solução:

Wasserblau 0,5 g

Orange G 2,0 g

Ácido fosfomolibdico 1% 100 cc

Corar 20 minutos.

d) Desidratação, diafanização e montagem em bálsamo do Canadá.

II.2.3.2 - Corifosfina (VIZIOLI-VIDAL, 1966)

a) Desparafinação e hidratação dos cortes

b) Tratamento por uma solução de corifos-

fina a 1/10.000 em tampão Mc Ilvaine, ao pH 4,5.

c) Secagem em papel de filtro e passagem pela solução saturada de sulfato de alumínio por 2 minutos.

d) Secagem em papel de filtro e montagem em óleo de parafina.

II.2.3.3 - Impregnação pela prata (GORDON & SWEET, 1936)

a) Desparafinação e hidratação dos cortes.

b) Passar pelo permanganato de potássio a 0,5%, durante 1 minuto.

c) Lavar em água e passar pelo ácido oxálico a 10% durante 1 minuto.

d) Lavar bem em água destilada; em seguida, tratar pelo alumen de ferro a 2%, por 2-15 minutos.

e) Lavar bem em água destilada.

f) Tratar pela solução argêntica de Wilder durante 5-7 segundos.

g) Lavar rapidamente em água e passar pelo formol neutro a 10% por 30 segundos.

h) Lavar em água e diferenciar em cloreto de ouro a 0,2% durante 1-3 minutos.

i) Lavar em água morna e passar pelo tiosulfato de sódio a 5% durante 5 minutos.

j) Lavar em água morna, desidratar e montar em bálsamo do Canadá.

II.2.4 - Estudos Histoquímicos

II.2.4.1 - Basofilia Metacromática.

a) Desparafinação e Hidratação dos cortes.

b) Coloração por uma solução de azul de toluidina a 0,025%, em tampão Mc Ilvaine, nos seguintes pH: 1,7 - 2,5 - 3,0 - 3,5 - 4,0 e 5,0, durante 25 minutos.

c) Lavar rapidamente em solução tampão de pH correspondente.

d) Passagem por uma solução, em partes iguais de molibdato de amônio a 5% e de ferricianeto de potássio a 1%, durante 4 minutos (recomendação de Mc CLUNG, 1961).

e) Lavar em água corrente.

f) Desidratar e montar em bálsamo do Canadá. Procedeu-se também o exame de basofilia metacromática na própria solução corante, do seguinte modo: após o item (c) goteja-se sobre o corte uma gota da solução corante, sempre de pH correspondente. A lâmina é colocada sobre o corte e procedeu-se ao exame microscópico, imediato. (procedimento recomendado por LISON-1960 e PEARSE-1960).

II.2.4.2 - Coloração pelo Azul de Alcian ao pH 2,5 (LISON, 1960).

a) Desparafinação e hidratação dos cortes.

b) Coloração pelo azul de alcian a 1%, em ácido acético a 1%, durante 10 minutos.

c) Lavagem em água corrente.

d) Desidratação e montagem em bálsamo do Canadá.

II.2.4.3 - Coloração pelo Azul de Alcian ao pH 1,0 (LEV & SPICER, 1964).

a) Cortes desparafinados e hidratados são corados por uma solução de azul de alcian a 1%, em HCl 0,1N, durante 30 minutos.

b) Secar em papel de filtro e, em seguida, na estufa a 37°C, durante 2 horas.

II.2.4.4 - Fluorescência pela Corifosfina (VIZIOLI & VIDAL, 1966).

a) Desparafinação e hidratação dos cortes.

b) Coloração por uma solução aquosa de Co-

rifosfina a 1/10.000, em tampão Mc Ilvaine, nos pH: 2,5 - 3,5 e 4,5.

c) Secagem em papel de filtro e passagem por uma solução de sulfato de alumínio concentrada, por 2 minutos.

d) Secagem em papel de filtro e montagem em óleo de parafina.

II.2.4.5 - Tratamento pela hialuronidase (LEPPI & STOWARD, 1965).

a) Cortes desparafinados e hidratados são incubados durante 1 a 2 horas a 37°C, numa solução a 0,05% de hialuronidase testicular, em tampão fosfato a 0,1M em pH 5,5.

b) Lavagem em água destilada e submete-se aos métodos indicativos de mucopolissacarídeos ácidos.

II.2.4.6 - Tratamento pela sialidase (QUINTARELLI e col., 1961).

a) Cortes desparafinados e hidratados foram incubados numa solução de sialidase, preparada da seguinte maneira: (170 g de NaCl + 2,72 g de KH_2PO_4 + 30 g de Na_2HPO_4) são dissolvidos em 1 litro de água destilada.

b) Antes do uso, uma parte da solução salina é diluída em 19 partes de água destilada, para produzir uma concentração final de 0,85% de NaCl e 0,005M de fosfato.

c) Misturar 1 ml da sialidase com 4 ml do tampão e conservar esta solução a 4°C.

d) De cada 6 horas, durante 24 horas, algumas gotas desta solução são colocadas sobre os cortes que estão conservados em estufa a 37°C.

e) Após esse período de incubação, os cortes foram tratados pelos métodos indicativos de mu-

copolissacarídeos ácidos.

II.2.4.7 - Reações de Bloqueio

Metilação (FISCHER & LILLIE, 1954)

a) Cortes desparafinados são levados ao álcool absoluto e, em seguida, tratados por uma solução de álcool metílico 100 ml + 0,8 ml de ácido clorídrico, a 58 - 60°C. O tempo de metilação é variável para as diferentes estruturas; no caso da gengiva, o tratamento foi de 10 horas.

b) Lavagem em álcool a 70% e posteriormente em água destilada. Em seguida, os cortes são tratados pelos métodos indicativos dos mucopolissacarídeos ácidos.

Saponificação (SPICER & LILLIE, 1959)

a) Cortes após a metilação são lavados com álcool 80%, coloidionados e tratados com uma solução de KOH a 1% em álcool a 80%, durante 20 minutos,

b) Lavados em álcool a 80% e água corrente.

c) Tratar pelos métodos para mucopolissacarídeos ácidos.

Hidrólise ácida (QUINTARELLI e col., 1961)

a) Cortes desparafinados são submetidos durante 4 horas, a 70°C à ação do tampão acetato (0,02M de acetato de sódio e 0,02M de HCl) pH 2,5.

b) Após lavagem, os cortes são submetidos aos métodos indicativos de grupos ácidos.

II.2.4.8 - Reação do (PAS) Ácido Periódico-Reativo de Schiff (Mc Manus, 1946)

a) Cortes desparafinados e hidratados são tratados por uma solução de ácido periódico a 0,5%, durante 5 minutos.

b) Lavados cuidadosamente em água corrente e, em seguida, com água destilada.

c) Tratados pelo reativo de Schiff, durante 15 minutos.

d) Lavados em 3 banhos de água sulfurosa, 1 minuto cada.

e) Lavados em água destilada, desidratados e montados em bálsamo do Canadá.

II.2.4.9 - Digestão de Glicogênio pela Amilase Salivar

a) Cortes desparafinados e hidratados são tratados com saliva durante 30 minutos, em placa de Petri fechada, provida com suporte para lâminas e forrada com papel de filtro umidecido. Os cortes controle são tratados com água destilada, nas mesmas condições.

b) Após esse tratamento, os cortes são lavados, desidratados, coloidionados e novamente hidratados. Em seguida, submetem-se-os à reação do PAS.

II.2.4.10 - Acidofilia Total - Para Proteínas (DEITCH, 1955)

a) Cortes desparafinados e hidratados são corados durante 15 minutos, por uma solução de Orange G a 0,1%, em tampão acetato de Na/HCl 0,1M, pH 1,7.

b) Após a coloração os cortes são diferenciados na mesma solução tampão, ao mesmo pH, durante 15 a 24 horas.

c) Lavagem rápida em álcool butílico terciário e xilol. Montagem em bálsamo do Canadá.

A técnica original foi alterada quanto ao corante, à concentração e ao pH da solução.

II.2.4.11 - Desaminação pelo Ácido Nitroso (LILLIE, 1958)

a) Tratar os cortes por uma solução em partes iguais de nitrato de Na a 27,6% e de ácido acé-

tico a 17,6%, durante 3 a 24 horas. Os cortes controlados são tratados com água destilada, nas mesmas condições.

b) Lavar e efetuar as reações para grupos básicos totais.

II.2.4.12 - Determinação Ponto Isoelétrico Aparente (PISCHINGER, 1926; laterada por LISON, 1960)

a) São usados 16 cortes de cada espécime examinado.

b) 8 deles são corados em azul de toluidina e 8 em xileno-cianol, durante 10 minutos. Ambos os corantes são usados na concentração de 0,1% (na técnica original 0,5%), tamponados em tampão Mc Ilvaine M/200 e nos seguintes pH: 2,2 - 3,0 - 3,8 - 4,6 - 5,4 - 6,2 - 7,0 - 7,8.

c) Lavagem rápida em solução tampão de pH correspondente.

d) Secar em papel de filtro e passar pelo álcool butílico terciário, xilol e montagem em bálsamo do Canadá.

O ponto iso-elétrico aparente da gengiva normal e da gengiva inflamada foram determinados através de uma combinação do microscópio "E. LEITZ ORTHOLUX" com um fotômetro "REMIPHOT D 959 REICHERT", da seguinte forma:

A intensidade de luz é regulada no amperímetro para 4,0. No trajeto luminoso adapta-se um dispositivo (disco de cartão preto) com um orifício central, que propicia a obtenção de um feixe de luz com foco puntiforme. Esse feixe luminoso, vindo de uma lâmpada de sódio (589 milimícrons) adaptada ao microscópio, passa também pelo corte e pela objetiva acromática de 45 X, alcançando o fotômetro.

No fotômetro, adapta-se uma escala linear de 0 a 100, dividida de 5 em 5 unidades, sendo o ponto

100 o máximo de absorção da luz e o ponto 0 a luminosidade que passa por um corte branco (sem coloração). Os resultados assim obtidos, são transformados em valores logarítmicos, uma vez que o funcionamento do "REMIPHOT" é condicionado à escala logarítmica.

Após a conversão os resultados são expressos em gráficos.

II.2.5. - Histofísica

II.2.5.1 - Dicroísmo (VIDAL, 1964b)

Os cortes corados pelo azul de toluidina a 0,025%, nos pH 4,0 e 5,0 ou impregnados pela prata, são examinados ao microscópio de polarização. Para a observação do dicroísmo o analisador é removido do trajeto luminoso, permanecendo em posição apenas o polarizador.

II.2.5.2 - Birrefringência (VIDAL, 1964b)

Para o exame de birrefringência o analisador é recolocado em posição, ficando, assim, os cortes entre o polarizador e o analisador.

III - RESULTADOS

III.1 - ESTUDOS MORFOLÓGICOS

A reação inflamatória, desencadeada provávelmente por agentes flogógenos encontrados no sulco gengival, localizava-se predominantemente na gengiva marginal, todavia, em muitos casos, envolvia também parte da gengiva inserida.

Na exposição dos estudos morfológicos procurar-se-á descrever as principais alterações morfológicas, decorrentes do processo inflamatório gengival, nas suas fases exsudativo-vascular e infiltrativa. Será objeto de estudo apenas o tecido conjuntivo (lâmina própria ou córion gengival), em virtude de ser nele que se instala e desenvolve o processo inflamatório.

De uma maneira geral, as transformações morfológicas caracterizavam-se por uma acentuada predominância dos fenômenos inflamatórios destrutivos (processos líticos), sôbre os fenômenos proliferativos. Dentro dêsse quadro podia-se, até certo ponto, distinguir duas áreas: uma, em que as estruturas normais, típicas da lâmina própria (substância fundamental e feixes de colágeno, especialmente) foram totalmente destruídas e substituídas por um infiltrado inflamatório, rico em células; e outra, contígua a essa, em que as estruturas do córion gengival, embora presentes, apresentavam diversos graus de modificações estruturais, provocadas pela reação inflamatória.

A fim de facilitar a exposição dos resultados, considerar-se-á a fase exsudativo-vascular como fase 1 e a fase infiltrativa como fase 2, sendo que os dados serão expostos nos seguintes tópicos:

- a) Edema (exsudato inflamatório);
- b) Substância fundamental;
- c) Alterações vasculares;

- d) Alterações celulares;
- e) " dos componentes fibrosos;
- f) " da membrana basal.

a) Edema: - Na fase 1, o edema intersticial, formado pelo exsudato inflamatório, variava segundo a intensidade da reação inflamatória. Assim, podia-se constatar exsudato do tipo seroso (mais comum), fibrinoso, hemorrágico e mesmo purulento em alguns casos.

Na fase 2, o edema, quase sempre, era menos intenso e formado de exsudato seroso.

b) Substância fundamental: - Tanto na fase 1 como na 2, notava-se zonas de desaparecimento da substância fundamental. Em outras áreas, a substância fundamental estava presente, porém, percebia-se que ela tinha perdido sua característica de uma massa homogênea e contínua, assumindo aspecto grumoso. Entre os pequenos grumos aparecia a imagem negativa do exsudato.

c) Alterações vasculares: - Na fase 1, notava-se grande número de pequenos vasos sanguíneos dilatados, com paredes finas e distendidas e, muitas vezes, congestionados (figs. 2, 3 e 4). Em muitos deles podia-se verificar a marginação leucocitária, e inclusive alguns neutrófilos atravessando a parede vascular (leucodiapedese) (figs. 5, 10, 13 e 14). A presença de pequenos vasos sanguíneos trombosados era constatada em alguns casos, cujas massas trombóticas eram formadas por uma rede de fibrina e restos de plaquetas, ou se apresentava como uma massa homogênea e hialinizada (fig. 4). Em uns poucos casos, ainda, podia-se perceber que essas massas trombóticas estavam em vias de calcificação (fig. 6).

As paredes vasculares apareciam bem distendidas, nas quais distinguam-se duas camadas: uma camada endotelial interna que, em cortes longitudinais, mostrava uma fileira de núcleos de endoteliócitos; e outra externa e mais espessa, formada por substância fun

damental, fibrilas de colágeno e alguns fibroblastos. Em muito dêstes vasos, as paredes estavam em desintegração e não tinham continuidade com os tecidos adjacentes (figs. 4 e 10).

De permeio, notava-se a presença de vasos neo-formados, os quais apresentavam-se com paredes um pouco mais espêssas, formadas de substância fundamental, fibrilas de colágeno e por células angioblásticas. Podia-se observar que as paredes vasculares dos vasos neo-formados não tinham continuidade com os remanescentes do tecido conjuntivo circundante. As paredes dêstes vasos também se apresentavam em desorganização (figs. 11, 12, 13 e 14).

Na fase 2, as alterações vasculares eram menos evidentes. Os vasos se apresentavam menos congestionados e raramente trombosados. Contudo, a desintegração das paredes vasculares também era notada nesta fase da inflamação. A presença dos vasos neo-formados, com as características já descritas, era mais frequente na fase infiltrativa.

d) Alterações celulares:— Um das principais modificações nas características morfológicas do córion gengival, nas duas fases do processo inflamatório aqui estudadas, era a substituição do componente fibroso gengival, por uma intensa infiltração inflamatória, rica em células (figs. 1, 2, 3 e 4). O conteúdo celular variava com o caráter inflamatório. O quadro histopatológico da fase 1 caracterizava-se pela presença de grande número de neutrófilos e linfócitos, acompanhados por uns poucos plasmócitos, eosinófilos, histiócitos, fibroblastos e células mesenquimais (figs. 1, 2 e 10). De permeio, eram notados restos nucleares e pequenas massas necróticas.

Na fase 2, o quadro citológico apresentava-se um pouco diferente. Os linfócitos e plasmócitos dominavam o campo e eram acompanhados por alguns his-

tiócitos, eosinófilos, neutrófilos, fibroblastos e células mesenquimais (fig. 3). As células mesenquimais eram notadas especialmente junto às paredes vasculares.

É interessante registrar, ainda, que os exames das preparações fluorocromizadas pela corifosfina revelaram grande variação do número de mastócitos, nas proximidades e à distância da área inflamada. Assim, era dado observar desde a presença de pequena quantidade de mastócitos em algumas preparações, até a presença de grande número deles em outras (fig. 17). Estas células apresentavam-se arredondadas (aspecto mais comum) ou fusiformes e muitas delas em estado de degranulação. Os grânulos mastocitários livres podiam ser vistos agregados às fibras colágenas ou às paredes vasculares (fig. 18). Na área de intensa reação inflamatória havia pouco ou nenhum mastócito.

e) Alterações dos componentes fibrosos:- Os feixes de colágeno estavam ausentes nas áreas de infiltração celular. Nas adjacências dessas áreas, os feixes de colágeno apareciam profundamente modificados. Nestas condições, eles se apresentavam com o aspecto de uma massa grumosa e amorfa; não se percebendo a sua morfologia característica, mesmo examinando-se em grande aumento (os feixes de colágeno, com essas características morfológicas serão denominados de FC₂) (fig. 8). Um pouco mais à distância onde a reação inflamatória era mais moderada, os feixes de colágeno estavam fragmentados e intumescidos, perdendo a sua ondulação característica. As suas fibras, igualmente, apresentavam-se rompidas, dissociadas e intumescidas (os feixes nestas condições serão denominados FC₁) (fig. 7). Por outro lado, podia-se constatar que o colágeno das paredes vasculares era o último a sofrer a degradação pela reação inflamatória (fig. 10).

Os estudos morfológicos do colágeno foram realizados em preparações coradas pelo tricrômico de Mallory, pela corifosfina e nas impregnações pela prata. As fibras reticulares (argirófilas - MELCHER, 1963), outro componente do estroma gengival, também eram observadas nas impregnações pela prata. Nas gengivites, tanto na fase 1 como na fase 2, as fibras reticulares estavam em todo o córion gengival, sendo porém, mais evidentes nos locais de exsudação e infiltração celular inflamatória ausentes de fibras colágenas. Elas se apresentavam bem escuras e formavam uma trama reticular que tinha continuidade com as paredes vasculares e membrana basal (fig. 9).

f) Membrana basal: - A membrana basal perde a sua característica de uma faixa fina, homogênea e contínua, que separa nitidamente o conjuntivo do epitélio. Em alguns casos, ela estava ausente completamente, em outros era difícil sua identificação.

III.2 - ESTUDOS HISTOQUÍMICOS

III.2.1 - Generalidades: - Quanto à fixação, deve-se registrar que não se conseguiram bons resultados com a solução de Newcomer. Por esta razão, os resultados histoquímicos a serem descritos, se referem às gengivas fixadas em soluções fixadoras de formol a 10% e formol-salino.

Verificou-se que não havia diferenças significantes, nos resultados dos estudos histoquímicos, entre as gengivites exsudativo-vasculares e infiltrativas, razão pela qual êstes estudos foram realizados, em ambos os tipos de gengivites, indistintamente. Paralelamente, fez-se o estudo histoquímico da gengiva normal, para servir de padrão.

Os estudos histoquímicos foram orientados no sentido da evidenciação dos mucopolissacarídeos ácidos carboxilados e sulfatados. Por outro lado, ou-

tras técnicas foram empregadas para a detecção de mucopolissacarídeos neutros e grupos proteínicos básicos totais, tendo por objetivo a tentativa do relacionamento dessas substâncias com os mucopolissacarídeos ácidos.

III.2.2 - Métodos para a evidenciação dos mucopolissacarídeos ácidos - Basofilia metacromática (azul de toluidina) e azul de Alcian.

Gengiva normal: - Os resultados das colorações com o azul de toluidina e o azul de alcian estão expostos, sob forma analítica, no quadro I. Não obstante essa forma de exposição permitir uma visão global do assunto, é interessante fazer as seguintes considerações complementares:

a) Prevenir que tôdas as vêzes que se fizer referência à metacromasia, está se tratando sempre da metacromasia não nuclêica.

b) A metacromasia ao azul de toluidina e a coloração pelo azul de alcian se achavam bem distribuídas por todo o córion gengival (figs. 19, 20, 23 e 24).

c) A positividade de ambas as colorações era um pouco mais intensa na camada reticular, do que na camada papilar do córion.

d) De permeio às estruturas constantes no quadro apareciam, embora em pouco número, os mastócitos, que também são metacromáticos e azul de alcian-positivos.

e) Os resultados da basofilia metacromática referem-se aos exames dos cortes corados pelo azul de toluidina e embebidos na própria solução corante, que apresentavam uma coloração metacromática um pouco mais intensa que aquela apresentada pelos cortes montados em bálsamo.

Gengiva inflamada :- Os resultados dos exames das preparações coradas com o azul de toluidina e o azul de alcian também estão contidos no quadro I. Contudo, são necessárias algumas considerações suplementares, a fim de torná-los mais elucidativos.

Nas áreas de infiltração celular inflamatória, verificava-se ausência ou presença em quantidades mínimas de substâncias metacromáticas ou azul de alcian-positivas (figs. 11, 14 e 15). Assim, os dados contidos no quadro I, concernentes às estruturas da gengiva inflamada, se referem aos remanescentes da substância fundamental, dos feixes de colágeno, das paredes vasculares e da membrana basal. Além dessas estruturas, apareciam metacromáticos e azul de alcian-positivos em mastócitos e as massas calcificadas (figs. 6 e 20).

Substância fundamental:- Os remanescentes da substância fundamental apresentavam uma metacromasia forte em pH 5,0, decrescendo de intensidade até o pH 3,5. Em pH 3,0, 2,5 e 1,7 não foi constatada a coloração metacromática. A coloração com o azul de alcian em pH 2,5 mostrava-se moderadamente forte, ao passo que em pH 1,0, a coloração apresentava-se muito fraca.

Feixes de colágeno:- Os resultados mostraram que os feixes de colágenos apresentavam uma certa variação na intensidade da metacromasia e positividade ao azul de alcian, segundo o seu aspecto de integridade. Os feixes de colágeno ligeiramente intumescidos e com as fibras parcialmente dissociadas (FC_1), apresentavam um aumento na intensidade da metacromasia e da coloração ao azul de alcian, em relação aos feixes normais (fig. 7). Por sua vez, os feixes de colágeno bem intumescidos, com aspecto de uma massa grumosa e amorfa (FC_2) exibiam metacromasia e

coloração pelo azul de alcian, cuja intensidade era média que aquela apresentada pelos feixes de colágeno normais (fig. 8).

Em uma amostra geral, a metacromasia era bem acentuada em pH 5,0 e decrescia bastante quando a coloração era feita em pH 4,0. A metacromasia manteve-se, embora muito fraca, em pH 3,5 e 3,0; enquanto que em pH 2,5 e 1,7, não era constatada a coloração metacromática. A coloração com azul de alcian em pH 2,5, revelava uma positividade moderadamente forte, ao passo que, em pH 1,0, a coloração era muito fraca.

Parades vasculares :- Nas áreas de edema e infiltração celular intensas, onde os feixes de colágeno já haviam desaparecido completamente e poucos restos da substância fundamental intercelular, as paredes vasculares, embora alteradas, permaneciam ainda bem metacromáticas e azul de alcian-positivas (figs. 11, 12, 13, 14 e 15). Todavia, em alguns vasos, podia-se notar as paredes vasculares em estado de desintegração e com perda de intensidade à essas reações histoquímicas.

Nas paredes vasculares, a basofilia metacromática e a positividade ao azul de alcian eram verificadas nas membranas basais peri-endoteliais, na substância fundamental e fibrilas de colágeno que envolvem a camada endotelial, especialmente dos vasos neo formados.

A metacromasia mostrava-se moderadamente forte em pH 5,0, média em pH 4,0 e fraca em pH 3,5 e 3,0. Em colorações em pH 2,5 e 1,7, a metacromasia estava ausente.

A coloração com azul de alcian em pH 2,5 mostrava-se moderadamente forte, enquanto em pH 1,0, a positividade era média.

Membrana basal :- Os remanescentes da mem

brana basal exibiam metacromasia média em pH 5,0 e fraca em pH 4,0 e 3,5. Não era constatada metacromasia em pH abaixo de 3,5. O azul de alcian mostrava uma coloração média em pH 2,5 e fraquíssima em pH 1,0.

Mastócitos:- As granulações citoplasmáticas dos mastócitos perdiam a intensidade da metacromasia e da coloração ao azul de alcian, quando localizadas na área da reação inflamatória.

III.2.3 - Métodos de digestões enzimicas e as reações de bloqueio

Os resultados das reações de bloqueio e das digestões enzimicas estão expostos no quadro II (doc. fotográfica figs. 21 e 22).

III.2.4 - Métodos do PAS para polissacarídeos neutros e do orange G para grupos básicos totais

Os resultados fornecidos pela reação do PAS e pela coloração com orange G, tanto para gengiva normal como para a inflamada, estão contidos no quadro III (figs. 16, 25 e 26). Deve-se acrescentar que as estruturas referentes às gengivas inflamadas correspondem aos remanescentes das referidas estruturas.

III.2.5 - Método da fluorescência pela corifosfina

As preparações fluorocromizadas com a corifosfina ao pH 4,5, revelaram na gengiva normal, uma fluorescência esverdeada mais ou menos forte para os feixes de colágeno, paredes vasculares e substância fundamental. Podia-se constatar ainda, que a fluorescência esverdeada perdia um pouco a intensidade, quando as preparações eram fluorocromizadas em pH 3,5 e 2,5. A membrana basal, em todos os casos, apresentava-se indistinta.

Exuberante fluorescência vermelho-alaran

jada era exibida pelas granulações citoplasmáticas dos mastócitos. Os mastócitos podiam ser vistos em estado de degranulação, notando-se, nestas condições, pequenos grânulos vermelho-alaranjados livres, junto às fibras colágenas e paredes vasculares (fig. 18). A cor e a intensidade da fluorescência das granulações dos mastócitos não sofriam modificações com o abaixamento do pH.

Nas gengivas inflamadas, as preparações fluorocromizadas com a corifosfina em pH 4,5, revelaram uma fluorescência parda-alaranjada nos feixes de colágeno e substância fundamental. As paredes vasculares permaneciam com a fluorescência esverdeada. Nas preparações fluorocromizadas com soluções em pH 3,5 e 2,5, podia-se perceber uma pequena mudança da cor, passando de parda-alaranjada para esverdeada. Nas áreas de exsudação e infiltração celular inflamatória diminuía a intensidade da fluorescência vermelho-alaranjada dos mastócitos.

Reações de bloqueio: - As preparações previamente submetidas aos tratamentos da metilação e metilação mais saponificação não exibiam a fluorescência descrita anteriormente, inclusive a dos mastócitos. Tanto as gengivas normais como as inflamadas exibiam, após esses tratamentos, uma fluorescência esverdeada, uniforme e muito pálida.

Tratamento pela hialuronidase testicular: - Nos cortes submetidos à digestão pela hialuronidase, observava-se, apenas uma diminuição muito leve, na intensidade da fluorescência esverdeada da gengiva normal e da fluorescência parda-alaranjada das gengivas inflamadas.

III.2.6 - Ponto iso-elétrico aparente (P.I.A.)

O traçado das curvas a partir das medidas de absorção da luz mostrava que, para os dados obtidos das gengivas normais, o cruzamento das curvas se dava ao nível do pH 4,5; para os dados das gengivas inflamadas, o cruzamento das curvas ocorria ao nível do pH 4,1 (gráfico nº 1).

GRÁFICO Nº 1

III.3 - ESTUDOS HISTOFÍSICOS (Ultraestrutura)

III.3.1 - Dicroísmo

Os exames do dicroísmo mostraram as seguintes características:

Gengiva normal:- Em preparações coradas com azul de toluidina, os feixes de colágeno, quando paralelos ao plano de polarização da luz, apresentavam uma coloração tendente a azulada (mais clara); ao serem colocados em posição perpendicular ao plano de polarização da luz, êstes feixes apresentavam uma coloração rosa-avermelhada, metacromática (mais escura) (figs. 27, 28, 29 e 30).

Em preparações impregnadas pela prata, os feixes de colágeno, em posição paralela ao plano de polarização da luz, mostravam uma coloração castanho escura, quase negra; enquanto que, em posição perpendicular, evidenciavam uma coloração castanha, bem mais cla

ra que na posição anterior (figs. 31, 32, 33 e 34).

As paredes vasculares mostravam-se fracamente dicróicas.

Gengiva inflamada: - Em preparações coradas com azul de toluidina, os feixes de colágeno intumescidos, com dissociação de fibras (FC_1), embora apresentando uma coloração metacromática um pouco mais acentuada que os feixes normais, não apresentavam alteração de côr, quando o plano de polarização da luz era mudado da posição paralela para posição perpendicular, demonstrando perda de dicróismo (figs. 35, 36, 37 e 38).

Em preparações impregnadas pela prata, os feixes de colágeno, nas condições acima descritas, mostravam uma ligeira diminuição na intensidade de côr, em relação aos feixes normais. Os exames de dicróismo também revelaram que a côr permanecia inalterável, com a mudança do plano de polarização da luz, da posição paralela para a perpendicular, em relação aos feixes de colágeno (figs. 39 e 40).

As paredes vasculares alteradas pela inflamação não revelavam dicróismo.

III.3.2 - Birrefringência

Gengiva normal: - A birrefringência aparecia bem evidente nos feixes de colágeno normais (fig. 41). Podia-se notar, ainda, a grande variação direcional que assumem os feixes de colágeno no córion gengival. Notava-se que à medida que se girava a platina do microscópio, a birrefringência desaparecia de uns e ia surgindo em outros feixes de colágeno.

Gengiva inflamada: - Nos feixes de colágeno em início de desintegração (FC_1) notava-se que a birrefringência era menor que aquela observada em feixes normais (fig. 41); ao passo que, os feixes de colágeno em adiantado estado de desintegração (FC_2) não se apresentavam birrefringentes.

QUADRO I
RESULTADOS DOS MÉTODOS HISTOQUÍMICOS PARA MUCOPOLISSACARÍDEOS ÁCIDOS (MPA)
(Basofilia metacromática (azul de toluidina) e azul de Alcian)

Corante	Gengiva Estruturas pH	N O R M A L					I N F L A M A D A						
		S.F.	F.C.	P.V.	M.B.	Aspecto geral	S.F.	F C ₁	F C ₂	P.V.	M.B.	M.C.	
Azul de Toluidina	5,0	+++	+++	++++	++++	++++	++	++	++++	++	+++	++	++++
	4,0	+	++	+++	+++	+++	+	+	++	+	++	+	+++
	3,5	+ -	+	+	+	++	+	+	+	+ -	+	+	++
	3,0	-	+ -	+	+	+	+ -	-	+	-	+	+ -	+
	2,5	-	-	+ -	+ -	+ -	-	-	-	-	-	-	+ -
	1,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Azul de Alcian	2,5	+++	++++	++++	++++	++++	++	++	++++	++	+++	++	++++
	1,0	+ -	+	+	+	++	+	+ -	+	+ -	+	+ -	+

LEGENDA:

S.F. = Substância Fundamental +++++ = Positividade Forte
F.C. = Feixes de Colágeno +++ = Positividade Moderada
P.V. = Paredes Vasculares ++ = Positividade Média
M.B. = Membrana Basal + = Positividade Fraca
M.C. = Massas Calcificadas + - = Positividade Muito Fraca
F C₁ = Feixes de Colágeno em início de desintegração - = Negativa
F C₂ = Feixes de Colágeno em estado adiantado de desintegração

QUADRO IV

RESULTADOS DOS TRATAMENTOS ENZÍMICOS E DAS REAÇÕES DE BLOQUEIO
PARA OS MUCOPOLISSACARÍDEOS ÁCIDOS

Colorações	Gengiva		NORMAL				INFLAMADA						
	pH	Estruturas	S.F.	F.C.	P.V.	M.B.	S.F.	F C ₁	F C ₂	P.V.	M.B.	M.C.	
		Reações											
Azul de Toluidina	5,0	Met.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Met. + Sap.	++	++	+++	++	+	+++	+	++	+	+++	
		Hial.	+ -	+	+	+ -	+ -	+	+ -	+	+	+ -	+
		Sial.+Met.+Sap.	++	++	++	++	+	+	+ -	++	+	+	++
		Hid.+Met.+Sap.	++	++	++	++	+	+	+ -	++	+	+	++
	4,0	Met.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Met. + Sap.	+	+	++	+	+	+	+ -	+	+	+	++
		Hial.	+ -	+ -	+ -	+ -	-	+ -	+ -	+ -	+ -	+ -	+
		Sial.+Met.+Sap.	+ -	+ -	+ -	+ -	+ -	+ -	-	+ -	+ -	+ -	+
		Hid.+Met.+Sap.	+ -	+ -	+ -	+ -	+ -	+ -	-	+ -	+ -	+ -	+
	3,5	Met.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Met. + Sap.	+ -	+ -	+ -	+ -	+ -	+ -	-	+ -	+ -	+ -	+ -
		Hial.	+ -	+	+ -	+ -	+ -	+ -	-	+ -	+ -	+ -	+
	2,5	Met.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Met. + Sap.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Met.		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Azul de Alcian	2,5	Met.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Met. + Sap.	++	+++	+++	++	++	++	+	++	+	++	
		Hial.	+	+	+	+	+ -	+	+ -	+	+	+	
		Sial.+Met.+Sap.	+	++	++	+	+	+	+	+	+ -	+	
		Hid.Ac+Met+Sap	+	++	++	+	+	++	+	+	+	+ -	++
1,0	Met.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Met. + Sap.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

LEGENDA (ver página 40)

LEGENDA DO QUADRO II

++++ = Positividade Forte
+++ = Positividade Moderada
++ = Positividade Média
+ = Positividade Fraca
+- = Positividade Muito Fraca
- = Negativa

S.F. = Substância Fundamental
F.C. = Feixes de Colágeno
P.V. = Paredes Vasculares
M.B. = Membrana Basal
F C₁ = Feixes de Colágeno em
 início de desintegração
F C₂ = Feixes de Colágeno em
 estado adiantado de de-
 sintegração
M.C. = Massas Calcificadas

Met. = Metilação
Sap. = Saponificação
Hial. = Hialuronidade Testicular
Sial. = Sialidade (Vibrio colerae)
Hid.ác. = Hidrólise Ácida

QUADRO III
RESULTADOS DAS REAÇÕES DO PAS PARA POLISSACARÍDEOS NEUTROS E DA ACIDOFILIA
PELO ORANGE G, PARA BASICOS TOTAIS (PROTEÍNAS)

Reações	Gengiva		NORMAL				INFLAMADA				
	pH	Estruturas Métodos	S.F.	F.C.	P.V.	M.B.	S.F.	F C ₁	F C ₂	P.V.	M.B.
PAS		Sem amilase	+	++	++++	++++	+	+++	++	+++	++
			+	++	++++	++++	+	+++	++	+++	++
Orange G	1,7	Sem desaminação	+	++++	++++	+++	+	++++	+++	+++	++
		Com desaminação	-	+	+	+	-	+	+	+	+

LEGENDA:

S.F. = Substância Fundamental	++++ = Positividade Forte
F.C. = Feixes de Colágeno	+++ = Positividade Moderada
P.V. = Paredes Vasculares	++ = Positividade Média
M.B. = Membrana Basal	+ = Positividade Fraca
F C ₁ = Feixes de Colágeno em início de desintegração	- = Negativa
F C ₂ = Feixes de Colágeno em estado adiantado de desintegração	

IV - DISCUSSÃO

IV. I - MORFOLOGIA

O córion gengival é formado por um tecido conjuntivo fibroso, constituído principalmente de fibras colágenas; fazendo parte, ainda, de sua estruturação as fibras reticulares e elásticas, vasos sanguíneos e linfáticos e células (mesenquimais, fibroblastos, histiócitos, mastócitos, etc.), que, em conjunto, estão embebidos pela substância fundamental.

Da integridade desse tecido conjuntivo dependem as características clínicas da gengiva normal (GLICKMAN-1958, GOLDMAN e col.-1960, ORBAN e col.-1960, BERNIER-1962 e MORGAN-1965).

O processo inflamatório, quando se instala no tecido conjuntivo, provoca diversas alterações morfológicas e certamente histoquímicas e histofísicas. O córion gengival, sendo um tecido conjuntivo, obviamente, também sofre uma série de modificações estruturais, quando atingido pelo fenômeno inflamatório.

Alguns autores descrevem, como características histopatológicas das gengivites crônicas, edema (exsudato inflamatório) e uma infiltração celular inflamatória de linfócitos e plasmócitos, como as células mais comuns, podendo aparecer um número variável de polimorfonucleares KRONFELD & BOYLE (1955), KERR & ASH (1960), ORBAN e col. (1960), BERNIER (1962) e STONES e col. (1962). Estes autores fazem uma descrição muito pobre das alterações histopatológicas do processo inflamatório gengival, pois não põem em relevo a destruição do componente fibroso — principal constituinte do córion gengival.

GOLDMAN e col. (1960) assinalam que a gengivite pode apresentar desde uma pequena infiltração celular inflamatória de plasmócitos, linfócitos e polimorfonucleares, acompanhada de uma proliferação moderada, até uma exsudação intensa, acompanhada ou não

da destruição do estroma fibroso. O autor em questão já relaciona a destruição do estroma fibroso com os fenômenos de exsudação; entretanto, afirma que nem sempre o estroma fibroso é destruído quando existem os fenômenos exsudativos. Estas observações estão em discordância com os resultados da presente pesquisa; os quais mostraram que os fenômenos exsudativos, no processo inflamatório gengival, sempre são acompanhados de destruição dos componentes fibrosos.

Para GLICKMAN (1958) as gengivites crônicas são caracterizadas pelas seguintes alterações morfológicas microscópicas: exsudato líquido e celular; neo-formação capilar, congestão vascular, proliferação do tecido conjuntivo e epitelial, hemorragia e degeneração do tecido conjuntivo e epitelial. Ele afirmou, ainda, que as variações histológicas são responsáveis pelas características clínicas da inflamação crônica gengival, tais como: a cor, a consistência e a textura. Dentro dessas variações, podem ser encontrados estados em que predominam os fenômenos exsudativos, juntamente com alterações destrutivas; e estados em que os fenômenos proliferativos são predominantes, sendo que essas variações estão relacionadas às diversas condições dos agentes etiológicos. Percebe-se que algumas modificações histológicas descritas pelo autor, são alterações que caracterizam a fase aguda da inflamação, depreendendo-se que a cronicidade referida está mais relacionada com a duração do processo, que, propriamente, com a natureza da reação inflamatória.

Um estudo dos aspectos histopatológicos das gengivites crônicas foi feito também por MELCHER (1962), que descreveu, principalmente, as modificações vasculares e dos feixes de colágeno do córion gengival. Contudo, a maioria das alterações descritas caracterizam os fenômenos agudos do processo inflamatório.

Depreende-se, dessas considerações, que o caráter da reação inflamatória e, conseqüentemente, a sua histopatologia, podem sofrer uma grande variação de acôrdo com a natureza e atuação dos agentes flogógenos. Outros autôres acham, ainda, que essas variações podem estar também relacionadas com o estado de sensibilidade individual KRONFELD & BOYLE (1955), KERR & ASH (1960) e BENATTI (1967).

As gengivites crônicas, muitas vêzes, são assim consideradas, não pela natureza inflamatória - em si, mas no sentido clínico, pelo tempo de duração do processo. Sabe-se, por outro lado, que as alterações morfológicas são diferentes nas diversas fases evolutivas do fenômeno inflamatório (RIBBERT & HAMPERL-1956, ROBBINS-1962, HEILMEYER & KAHLER-1964), - sendo de se esperar que as propriedades bioquímicas também o sejam.

A observação dos resultados da presente pesquisa mostrou que a modificação morfológica mais-evidente, quando predominam as fases exsudativo-vasculares e/ou infiltrativa da inflamação gengival, é o desaparecimento e substituição de grande parte das estruturas normais — substância fundamental, paredes vasculares e feixes de colágeno — por uma infiltração inflamatória.

Os feixes de colágeno sofrem profundas alterações morfológicas em decorrência da reação inflamatória (RAY & ORBAN-1948, ARNIM & HAGERMAN-1953, GOLDMAN-1952, JACKSON-1957, SCHULTZ-HAUDT & AAS-1960, MELCHER-1962 e MORGAN-1965). Êste fato foi confirmado neste trabalho. Pôde ser constatado também que a destruição do colágeno pela inflamação se faz aos poucos, progressivamente, iniciando-se com um simples intumescimento dos feixes e terminando com a sua completa desintegração. Esta destruição do colágeno está diretamente relacionada com a presença de

ênzimos mucolíticos e colagenolíticos produzidos por bactérias existentes no sulco gengival (SCHULTZ-HAUDT e col.-1954, LUCAS & THONARD-1955, SCHULTZ-HAUDT & CHERP-1955 a e b, SCHULTZ-HAUDT & CHERP-1956, MACDO - NALD e col.-1960, THILANDER-1963) e com ênzimos produ zidos no próprio tecido inflamado (VIDAL & BENATTI - 1963ç, HOUCK & JACOB-1961 a e b, FULLMER-1966, FULLMER & GIBSON-1966, TRIFTZHAUSER-1967).

Os resultados mostraram que a parede vas- cular, embora sofrendo alterações, parece ser a estru tura que mais resiste à ação destruidora do processo inflamatório.

Os exames de fluorescência permitiram ob- servar alguns aspectos morfológicos interessantes dos mastócitos, como a forma (arredondada e fusiforme), o estado de degranulação e a grande variação do seu nú- mero e distribuição, nos diversos espécimens examina- dos.

A constatação da forma arredondada e fusi forme dos mastócitos vem concordar com os achados de alguns autôres (CARRANZA & CABRINI-1955, BURTON-1963, DIENSTEIN e col.-1966, ANNEROTH-1963).

A degranulação do citoplasma dos mastóci- tos é um fato amplamente conhecido. Alguns autôres ad vogam que, após a degranulação, os grânulos mastocitá rios livres seriam fagocitados por macrófagos e fibro blastos e remetabolizados (HIGGENBOTHAN e col. - 1956, VIZIOLI & FERNANDES-1965). Outros autôres sugerem que a heparina, contida nessas granulações, seria uma for ma armazenada da substância fundamental (ASBOE-HANSEN -1950 e 1959, RILEX-1962, LIKAR e col.-1964). É opi- nião do autor do presente trabalho que estas granula- ções estejam relacionadas com a reposição dos mucopo- lissacarídeos destruídos pelo fenômeno inflamatório ; entretanto, não se tem condições para explicar o modo pelo qual isto se processa.

Com referência à população dos mastócitos, os resultados dos trabalhos encontrados na literatura são altamente variáveis e contraditórios. Quase todos os autores são concordes em que a gengiva normal apresenta um número apreciável de mastócitos. Por outro lado, há uma grande discrepância nos resultados, no que tange ao número dessas células na gengiva inflamada. Assim, em relação ao número encontrado na gengiva normal, TODORO (1938), STELLA (1957), DEWAR (1955), SOGNAES e col. (1956) e TERNER (1967) verificaram um aumento, enquanto que CARRANZA & CABRINI (1955), COLONIUS (1959), DUMMET e col. (1963) encontraram uma diminuição de mastócitos. Isto vem de encontro aos resultados da presente pesquisa, que evidenciavam casos com diminuição, casos com igualdade e casos com aumento do número dessas células. De outra parte, na área de intensa reação inflamatória, existem poucos ou nenhum mastócito, fato também relatado por TERNER (1967).

Acredita-se que seja importante a função dos mastócitos, mormente em se sabendo que eles encerram diversas substâncias, como heparina, histamina, serotonina, lipídios e várias proteases (HALL-1966, DIENSTEIN-1967, IGNACIO-1964).

Para HALL (1966) "... a presença de grande número de mastócitos na gengiva normal sugere um papel fisiológico para os mesmos, ao passo que a grande variação do número e distribuição dessas células na inflamação, sugere que elas também desempenhem uma função importante no fenômeno inflamatório".

IV.2 - HISTOQUÍMICA

É necessário fazer uma apreciação preliminar sobre o significado das técnicas empregadas para a evidenciação dos mucopolissacarídeos ácidos, com o propósito de fixar o critério pelo qual serão interpretados os resultados histoquímicos.

Os mucopolissacarídeos ácidos, de acôrdo com a natureza dos seus grupamentos ácidos, são divi didos em carboxílicos (-COOH) e sulfatados (-OSO₃H).

Os métodos que parecem oferecer melhores resultados para a detecção dessas substâncias, lógicamente dentro dos limites de segurança que se pode esperar das técnicas histoquímicas em geral, são os métodos da basofilia metacromática pelo azul de toluídina e a coloração pelo azul de alcian, aliados às técnicas de bloqueio (metilação, metilação mais saponificação e hidrólise ácida) e às digestões enzimicas pela hialuronidase testicular e pela sialidase.

Basofilia metacromática:— Este método pode ser utilizado para a detecção dos mucopolissacarídeos ácidos de uma maneira geral, ou para a distinção dos grupamentos responsáveis pelo caráter ácido. Sabe-se que o pK dos grupos carboxílicos situa-se entre 4 e 5 e o dos sulfatos bem mais abaixo (LANDSMEER-1951, BOOY e col.-1953, DEIERKAUF & HEGNAUER-VOGENLENZANG-1953, BOOY & LOEVEN-1954, LANDSMEER & GIEL-1956). Pode-se, então, diferenciar os sulfatos dos carboxílicos, fazendo colorações com soluções em diferentes pH. A metacromasia revelada pelas estruturas, coradas com soluções acima do pH 3,4, são devidas aos mucopolissacarídeos ácidos carboxilados e/ou sulfatados, enquanto aquela revelada a êsse pH ou abaixo, são devidas, exclusivamente, aos mucopolissacarídeos ácidos sulfatados. Seguindo êsse raciocínio, tôda a metacromasia perdida ao abaixar o pH da solução corante de 5,0 para 3,4, pode ser considerada como devida aos grupos carboxílicos, ao passo que, a metacromasia conservada a êste pH ou abaixo, revela a presença de mucopolissacarídeos ácidos sulfatados (LISON - 1960).

Azul de Alcian:— LISON (1960) afirmou que "a coloração pelo azul de alcian, embora não podendo

ser considerada, ainda, um método histoquímico absolutamente específico, é um dos melhores métodos atuais para a demonstração de mucopolissacarídeos ácidos, e que a possibilidade de ser controlada pela metilação faz aumentar a sua especificidade".

O emprêgo do azul de alcian em pH 2,5 (LISON-1960) evidencia mucopolissacarídeos com radicais ácidos carboxílicos e sulfatados. O uso dêste corante, em pH mais baixo, tem sido um meio para diferenciação dos mucopolissacarídeos ácidos com radicais sulfato. LEV & SPICER (1964) constataram que estruturas contendo radicais sulfatados coravam-se, seletivamente, com a solução de azul de alcian em pH 1,0. Essa conclusão foi confirmada pelo trabalho de SPICER & DUVENCI (1964), que obtiveram resultados idênticos com a coloração do azul de alcian em pH 1,0 e com a incorporação do enxôfre radioativo, em secreção glandular de alguns mamíferos.

Relação entre Azul de Toluidina e Azul de Alcian: - É interessante traçar aqui um paralelo entre as colorações com o azul de toluidina e com o azul de alcian em relação à evidenciação dos mucopolissacarídeos sulfatados. SPICER (1960) atribui à metacromasia em pH 1,5 o mesmo significado que a basofilia do azul de alcian em pH 1,0. Para FAVA DE MORAES (1964) a coloração pelo azul de alcian em pH 0,5 apresentava o mesmo significado que a coloração pelo azul de toluidina em pH 1,7; ao passo que, para MUNHOZ (1967) a coloração pelo azul de alcian em pH 1,0 equivalia à coloração pelo azul de toluidina em pH 2,2. Como se vê, há uma certa discordância nos resultados dêsses autores, sendo interessante lembrar que os mesmos fizeram seus estudos histoquímicos em glândulas salivares de mamíferos, onde os mucopolissacarídeos, talvez, se apresentam em estado mais livre e/ou em maior concentração que no córion gengival. Os resultados desta pes

quiza mostraram que na gengiva, onde os mucopolissacarídeos ácidos estão intimamente associados a proteínas, a coloração pelo azul de alcian, em pH 1,0, apresentou o mesmo significado que a metacromasia em pH 3,5.

Metilação:- A metilação elimina, por hidrólise, os grupos sulfatados e esterifica os grupos carboxílicos (LISON, 1960).

Saponificação:- A saponificação, após a metilação, elimina o grupo metil do ester carboxílico e, em consequência, restabelece integralmente as propriedades primitivas dos polissacarídeos não sulfatados (LISON, 1960).

Com base nessas observações, admite-se que as técnicas da metilação e da metilação mais saponificação podem ser usadas para a distinção dos grupos carboxílicos e sulfatados, apesar de não ter sido conseguida, por alguns autores, a reversão da basofilia, após a metilação mais saponificação, em estruturas contendo grupos carboxílicos (MOWRI-1960, QUINTARELLI-1963, FAVA DE MORAES-1964, MUNHOZ-1967).

Hidrólise ácida:- Segundo QUINTARELLI e col. (1961) as estruturas originalmente alcian blue positivas, que diminuírem ou perderem a positividade com o tratamento prévio pela hidrólise ácida, indicam a presença de ácido siálico.

Métodos de digestão enzimica:- Em vista das reações histoquímicas não apresentarem uma especificidade absoluta, os métodos de digestão enzimica, assim como as técnicas de bloqueio, são muito importantes como coadjuvantes na evidenciação dos mucopolissacarídeos ácidos.

Hialuronidase testicular:- Inicialmente, acreditava-se a hialuronidase testicular tivesse ação apenas sobre o ácido hialurônico, entretanto, sabe-se hoje que ela não apresenta essa especificidade, pois

age, também, sobre o ácido condroitin-sulfúrico, tipos A e C.

Sialidase:- A sialidase tem sido empregada com a finalidade de digerir o ácido siálico (SPICER & WARREN-1960, QUINTARELLI-e col.-1961), os quais também possuem os radicais carboxílicos. O tratamento pela sialidase ou pela hidrólise ácida, em eliminando o ácido siálico, facilita a identificação dos mucopolissacarídeos ácidos carboxílicos.

Corifosfina:- É recente o emprêgo da corifosfina como corante para MPA (VIZIOLI & VIDAL, 1966). Estes autôres elaboraram um trabalho histoquímico, tendo por substrato a traquéia e parede arterial de cobaia, no qual preconizam o uso da corifosfina para a detecção dos mucopolissacarídeos ácidos. Pelo que foi dado observar no presente trabalho, parece ser a corifosfina mais indicada para a detecção de algum mucopolissacarídeo ácido com radical sulfatado.

Em vista do que foi analisado, será utilizado, o seguinte critério para a interpretação dos resultados:

Mucopolissacarídeos ácidos sulfatados:- Serão considerados como contendo mucopolissacarídeos ácidos sulfatados as estruturas:

a) Coradas metacromáticamente pelo azul de toluidina, em pH 3,5 ou abaixo, após o tratamento prévio pela sialidase ou pela hidrólise ácida;

b) Coradas pelo azul de alcian em pH 1,0;

c) As colorações pelo azul de toluidina, acima do pH 3,5 e pelo azul de alcian a pH 2,5, suprimidas pela metilação e não revertidas pela saponificação.

Mucopolissacarídeos ácidos carboxilados :- Serão consideradas como devidas aos mucopolissacarídeos ácidos carboxilados:

a) A parte da coloração metacromática pelo azul de toluidina em pH 5,0 e do azul de alcian em

pH 2,5, suprimidas pela metilação e revertidas pela saponificação, em preparações que foram, previamente, tratadas pela hidrólise ácida ou pela sialidase;

b) A parte da coloração metacromática perdida com o abaixamento do pH de 5,0 para 3,5 e da coloração do azul de alcian, também perdida com o abaixamento do pH 2,5 para 1,0, em preparações que sofreram tratamento prévio pela sialidase ou pela hidrólise ácida.

Ácido siálico:— Serão consideradas como sendo devidas à presença de ácido siálico:

a) A diminuição da coloração provocada pelo tratamento prévio com sialidase ou pela hidrólise ácida, em preparações metiladas e saponificadas e coradas pelo azul de toluidina em pH 5,0 e 4,0 ou pelo azul de alcian em pH 2,5.

b) A parte da metacromasia suprimida com o tratamento prévio pela sialidase, em preparações coradas pelo azul de toluidina em pH 3,5.

Mucopolissacarídeos Ácidos na Gengiva

A existência dos mucopolissacarídeos ácidos no córion da pele, já foi descrita por muitos autores (PEARSE & WATSON-1949, CAMPANI & REGIANINI - 1950, BUNTING-1950, BUNTING & WHITE-1950, MEYER & RAPPORT-1951, MONTAGNA-1956, STEIN & WOLMAN-1958, GOLTZ e col.-1958, SAMS JR. e col.-1962).

No tecido conjuntivo gengival, os resultados da presente pesquisa, de acordo com o critério estabelecido para interpretação, revelou a presença dos ácidos: hialurônico, condroitin sulfatos A ou C e B, ácido siálico, distribuídos junto aos feixes de colágeno, paredes vasculares, substância fundamental e, também, junto à membrana basal, e de heparina existente nas granulações citoplasmáticas dos mastócitos. Os resultados expostos no quadro I e II, ainda

permitem deduzir que: a) entre os mucopolissacarídeos presentes no córion gengival o ácido hialurônico existe em maior quantidade; b) os mucopolissacarídeos sulfatados estão presentes preferentemente junto aos feixes de colágeno, paredes vasculares e também na membrana basal. Estes resultados de alguma forma são concordes com os achados de outros autores, que também relataram a presença de mucopolissacarídeos ácidos na lâmina própria gengival. Assim, em trabalhos histoquímicos, pode-se reportar os trabalhos de CABRINI & CARRANZA (1956), que fazem menção à coloração metacromática, localizada especialmente junto aos feixes de colágeno, membrana basal e nos mastócitos; FASSKE & MORGENTHAU (1958), que utilizando como corante o azul de toluidina e o azul de alcian, detectaram ácido hialurônico e condroitin sulfato, na lâmina própria da gengiva; QUINTARELLI (1960) empregando as colorações pelo azul de toluidina e azul A, juntamente com a hialuronidase testicular, constatou a presença de condroitin sulfato e de ácido hialurônico, FERRIGNO & BHUSSRY (1961), empregando as técnicas do azul de toluidina e da captura do ferro coloidal, faz referência a mucopolissacarídeos ácidos no conjuntivo gengival; SCHULTZ-HAUDT (1966) em trabalho sobre a revista de literatura, concluiu pela presença na gengiva dos ácidos hialurônico, condroitin sulfatos A, B e C e heparina; FUCHS & CIECIURA (1967) utilizando-se dos métodos do azul de toluidina e azul de alcian, também evidenciaram mucopolissacarídeos ácidos no conjuntivo da gengiva.

A presença desses carboidratos na gengiva também foi demonstrada através de métodos bioquímicos: SCHULTZ-HAUDT (1958) identificou, através da eletroforese, colorimetria e cromatografia, o ácido hialurônico, condroitin sulfato A, B e C; SCHULTZ-HAUDT e col. (1964), através da eletroforese, combinada com as colorações do PAS, azul de toluidina, azul de al-

cian e ferro coloidal e mais a hialuronidase testicular, isolaram os ácidos hialurônico, condroitin sulfato A ou C e B e mucopolissacarídeos neutros; THONARD & BLUSTEIN (1965), fazendo uso dos métodos cromatográfico e colorimétrico, identificaram os ácidos hialurônico, condroitin sulfato e mais o ácido siálico.

Os resultados aqui expostos, por outro lado, estão em discordância com as conclusões de GLICKMAN & SMULOW (1966) os quais afirmaram que o córion da gengiva normal não apresentava metacromasia e que esta somente aparecia muito fracamente na camada reticular, em associação com a inflamação.

Técnicas do "PAS" para Polissacarídeos Neutros e da Acidofilia pelo Orange G para os Radicais Básicos Totais.

Glicoproteínas e mucoproteínas (mucopolissacarídeos neutros) têm sido detectadas histoquímica e bioquimicamente, no conjuntivo gengival, por diversos autores. TURESKY e col. (1951), ENGEL (1953), CABRINI & CARRANZA (1956), SCHULTZ-HAUDT e col. (1961 e 1964) e GLICKMAN & SMULOW (1966) demonstraram que estas substâncias estão distribuídas na substância fundamental, feixes de colágeno, paredes vasculares e membrana basal. Estes resultados foram confirmados nesta pesquisa, conforme pode ser visto no quadro III.

A determinação dos radicais básicos totais, através de um corante aniônico, é um método que tem sido usado em histoquímica. O termo acidofilia total - usado por LISON (1960), representa a soma destes radicais, revelados por corantes básicos em pH bastante baixo.

O corante usado aqui, para a avaliação da acidofilia total, foi o orange G, preconizado, primeiramente, por FRAENKEL-CONRAT & COOPER (1944) e, posteriormente, usado por SOLOMONS (1958) e MORGAN (1965).

Empregou-se o orange G em pH bem inferior ao empregado por DEITCH (1955) para o amarelo naftol S, pois, segundo LISON (1960), o pH 2,78 é um pouco alto, no qual não haveria uma descarga completa dos radicais eletronegativos da preparação, os quais entrariam, então, em competição com os anions do corante, pelos grupos básicos, causando, assim, alterações nos resultados. Os resultados, expostos no quadro III, mostram uma coloração bem distribuídas por tôdas as estruturas da lâmina própria gengival.

O confronto dos resultados, obtidos pelos métodos para mucopolissacarídeos ácidos, neutros e para proteínas, mostra que há uma concomitância na localização dessas substâncias junto às estruturas do conjuntivo gengival, demonstrando, por conseguinte, que elas co-participam de um edifício macromolecular, onde existe uma perfeita interligação dos seus grupos polares.

IV.2.1 - Mucopolissacarídeos Ácidos e o Processo Inflamatório

Encontrou-se certa dificuldade em estabelecer uma comparação dos resultados da presente pesquisa com os resultados obtidos por outros autores, no que concerne à relação dos mucopolissacarídeos ácidos e o processo inflamatório. Esta dificuldade surgiu, em virtude da falta de especificação, por parte da maioria dos pesquisadores, do estado ou da fase da inflamação, em que as respectivas pesquisas foram realizadas.

Um bom número de pesquisas, nesse campo, trazem como conclusões um aumento dos mucopolissacarídeos ácidos, como consequência da reação inflamatória. Percebe-se, entretanto, das conclusões de BALAZS & HOLMGREN (1950), HUDACK e col. (1949), DUNPHY & UDUPA (1955), HOUCK e col. (1962), VIKHERT e col. (1962), DELAUNAY & BAZIN (1963), KASSABIAN (1964) e FUCKS &

CIECIURA (1967) descritos no capítulo da introdução, que o aumento dos mucopolissacarídeos ácidos, relatado por êsses autôres, está sempre relacionado com fenômenos proliferativos, o que, aliás, é um fato esperado, visto que em sendo os mucopolissacarídeos ácidos componentes dos feixes de colágeno, é necessária a sua elaboração para que aquêles sejam formados. Porém, o que aconteceria nos casos em que houvesse a quebra da homeostasia tecidual, e que as condições metabólicas locais fôsem adversas à proliferação? É de se acreditar que isto possa ocorrer em certas condições especiais, relacionadas com a localização e a morfologia dos tecidos e com as peculiaridades dos agentes flogógenos. Para JACKSON (1957) o desaparecimento das fibras colágenas, no processo inflamatório gengival, pode não ser somente devido à sua destruição, mas também, à falta de sua elaboração por um impedimento da síntese ou da organização de seus precursores.

Crê-se que seja oportuno citar aqui o trabalho de KASABYAN (1964), o qual em trabalho histoquímico de nódulos tuberculosos e focos exsudativos, verificou que o conteúdo em glicogênio e mucopolissacarídeos ácidos variava com o caráter da reação biológica e com o tipo de alterações morfológicas produzidas; encontrando um acúmulo de mucopolissacarídeos ácidos nas áreas de proliferação, muito pouca quantidade nos focos de exsudação e o desaparecimento dessas substâncias nos locais de necrose.

Em parte, êstes resultados são concordes com os de CELLARIUS (1963), que concluiu pela inexistência de mucopolissacarídeos nos tecidos necróticos e em decomposição purulenta, e com os de HOUCK e col. (1962), que verificaram, como resposta química da derme no local da inflamação e necrose, uma redução dos mucopolissacarídeos ácidos e de colágeno insolúvel,

ao passo que no processo reparativo ocorria um aumento dessas substâncias. FUCKS & CIECIURA (1967) encontram uma reação metacromática muito fraca nas áreas infiltradas por linfócitos e por "pequenas células redondas", na doença periodontal crônica. Outros autôres, ainda, associaram a diminuição de mucopolissacarídeos ácidos com a inflamação (TURESKY e col.-1951 e SCHULTZ-HAUDT-1957).

Os resultados morfológicos, aqui expostos, mostram que o processo inflamatório, nas fases exsudativo-vascular e infiltrativa, provocam transformações e destruição das estruturas normais, próprias do conjuntivo gengival (substância fundamental, feixes de colágeno e paredes vasculares), as quais são substituídas pelo exsudato e infiltrato celular inflamatórios. Ora, em se sabendo que estas estruturas contêm uma quantidade apreciável de mucopolissacarídeos ácidos, era de se esperar, então, que ocorresse uma diminuição destas substâncias. Esta hipótese foi inteiramente comprovada pelas reações histoquímicas levadas a efeito nesta pesquisa; portanto, verificou-se que, nas áreas de intensa exsudação e infiltração celular, havia uma acentuada diminuição das reações para mucopolissacarídeos ácidos.

Os achados da presente pesquisa estão em discordância com os resultados de QUINTARELLI (1960), o qual encontrou um aumento dos mucopolissacarídeos ácidos na gengiva inflamada e afirmou que as reações para estas substâncias eram mais fortes na área de infiltração celular inflamatória; são discordantes também, dos resultados de STAHL (1958) que encontrou um aumento de mucopolissacarídeos ácidos associados com um aumento das fibras reticulares, pois, pôde-se constatar no presente trabalho que, onde havia um aumento na visualização das fibras reticulares, era justamente a área em que ocorria uma diminuição das reações para mu-

copolissacarídeos ácidos.

Sabe-se, por outro lado, que a ação destrutiva do fenômeno inflamatório, na gengiva especialmente, se faz à custa de uma atividade enzimática proteolítica e mucolítica, que promovem a lise do colágeno e a despolimerização dos mucopolissacarídeos.

Os resultados desta pesquisa mostram, nas áreas adjacentes ao foco inflamatório, que os feixes de colágenos se apresentam em vários graus de desintegração. O colágeno é constituído por uma estrutura fibrilar protéica, formada por cadeias de amino-ácidos (especialmente prolina, hidroxiprolina e glicina), envolvidas por mucopolissacarídeos, que funcionam como substâncias cimentantes, formando portanto macromoléculas glicoprotéicas. Os mucopolissacarídeos ácidos, segundo JACKSON (1953), GEBHARDT (1960) e ALBERTINI (1961), desempenham importante papel na estabilidade dos feixes de colágeno.

Os feixes de colágeno que mostram as primeiras alterações morfológicas, causadas pela inflamação, exibiram um aumento na intensidade das reações para proteínas e para mucopolissacarídeos ácidos e neutros. Isto talvez aconteça em consequência do rompimento da ligação polissacarídeos-proteína, deixando maior número de grupos reativos livres e em condições de se ligarem mais facilmente aos corantes. Esta hipótese, levantada por WALTON & RICKETTS (1954), foi endossada por QUINTARELLI (1960) e MORGAN (1965); se verdadeira, viria demonstrar não um aumento da quantidade dessas substâncias, mas um desarranjo em seu estado de agregação e apenas um aumento da sua capacidade de reagir.

Nos feixes de colágeno, em estado mais adiantado de desintegração (FC_2) haveria uma despolimerização das macromoléculas de mucopolissacarídeos ácidos e uma desorganização das cadeias polipeptídicas das proteínas. A confirmação desta hipótese será tentada,

quando da discussão do dicroísmo e da birrefringência.

A maior evidenciação das fibras reticulares nas áreas ausentes de fibras colágenas, faz supor que, nos locais onde isto não ocorre, as fibras reticulares ficam encobertas pela presença predominante daquelas; hipótese, aliás, já levantada por MELCHER (1965).

De outra parte, a permanência de vasos e o aparecimento de vasos neo-formados, na área de exsudação e infiltração celular inflamatória merece ser considerada. Observou-se que os vasos, aí presentes, conservavam aparentemente suas características histoquímicas, entretanto, suas paredes estavam alteradas e não mantinham continuidade estrutural com o tecido conjuntivo circundante, que se apresentava morfológica e histoquimicamente alterado. Nessas condições, as paredes vasculares não apresentam mais a integridade funcional, ocorrendo um aumento acentuado em sua permeabilidade.

As paredes vasculares dos vasos neo-formados são anormalmente permeáveis e extremamente frágeis, porque nelas a membrana basal inexistente ou está deficientemente formada (SCHOEFL, 1964). Quanto aos vasos pré-existentes, especialmente vênulas, além de se apresentarem dilatados, suas paredes apresentavam modificações estruturais, causadas pela ação de enzimas (mucopolíticos e proteolíticos especialmente) existentes no tecido inflamado, que causam a despolimerização dos mucopolissacarídeos ácidos a lise das proteínas, provocando a desintegração da membrana basal e do tecido conjuntivo envolvente. A ação de enzimas sobre a parede vascular já foi relatada por ZWEIFACH (1953); esse autor observou que, quando se introduzia hialuronidase nos tecidos, esta provocava a desintegração da membrana peri-endotelial e, conseqüentemente, um aumento de permeabilidade da parede vascular. Além disso é interessante lembrar que as terminações nervosas perivasculares, que controlam o tônus vascular, muito provável-

mente sofrem a ação destrutiva do processo inflamatório, contribuindo para a perda da capacidade funcional dos vasos.

IV.2.2 - Fluorescência pela Corifosfina

Alguns trabalhos têm preconizado o uso de corantes fluorescentes para a pesquisa topoquímica dos mucopolissacarídeos ácidos (SAUNDERS-1964, VIZIOLI & VIDAL, 1966).

Os resultados do trabalho, com referência ao estudo nos mucopolissacarídeos ácidos, empregando a solução de corifosfina, não chegaram a ser satisfatórios. Não se obteve os resultados preconizados pelos autores do método empregado.

A lâmina própria gengival, contendo em sua estrutura uma apreciável quantidade de mucopolissacarídeos ácidos, como já foi relatado por diversos autores e confirmado, por outros métodos, nesta pesquisa, tinha que apresentar uma coloração fluorescente alaranjada bem pronunciada, visto ser, a fluorescência, um método histoquímico muito sensível. A coloração alaranjada pôde ser constatada apenas nas granulações citoplasmáticas dos mastócitos, provavelmente, devida à presença da heparina.

As técnicas de bloqueio e da digestão enzimica também não apresentaram resultados que pudessem contribuir para a evidenciação dos mucopolissacarídeos ácidos pela corifosfina, pois os resultados mostravam que a pequena queda da intensidade da fluorescência, causada pela metilação, não era revertida pela saponificação e a digestão pela hialuronidase testicular também não provocava alterações significativas na coloração fluorescente.

IV.2.3 - Ponto Isoelétrico Aparente

Entende-se por ponto iso-elétrico de uma substância o estado de equilíbrio entre suas cargas

positivas e negativas; se, nestas condições, fôr colocada em campo elétrico, tais cargas não migrariam para nenhum dos polos. O ponto iso-elétrico aparente é aquele obtido através de medidas de absorção de luz em cortes histológicos, representando o ponto de cruzamento das curvas obtidas com dois corantes — um ácido e um básico — empregados em diferentes pH, desde 2,2 até 7,8, em intervalos iguais de 0,8 (método de PISCHINGER, 1926).

Para LISON (1960), o ponto isoelétrico aparente não deve ser confundido com o ponto iso-elétrico determinado pela eletroforese, pois não há correspondência de valores, todavia isto não impede que o ponto iso-elétrico aparente, obtido através das curvas de absorção, seja um dado de valor para o estudo das proteínas e de suas propriedades eletropolares.

Na literatura encontramos em PEARSE (1960), a referência sobre o ponto iso-elétrico do colágeno, o qual afirma estar o mesmo situado entre os pH 4 e 5.

Os resultados desta pesquisa mostraram que o P.I.A. da lâmina própria gengival (substância fundamental, paredes vasculares e feixes de colágeno, especialmente) situava-se, também, entre o pH 4 e 5; além disso, pôde-se constatar que o ponto iso-elétrico aparente do córion da gengiva normal diferia daquele encontrado nas estruturas modificadas pela reação inflamatória. Esta variação do ponto iso-elétrico aparente, provavelmente, não indique apenas desarranjos no componente proteínico, mas uma desorganização estrutural do "edifício" macromolecular formado de proteínas e carboidratos, que são os principais componentes da lâmina própria gengival.

IV.3 - HISTOFÍSICA (Ultraestrutura)

IV.3.1 - Dicroísmo

O dicroísmo apresentado pelos cortes corados pelo azul de toluidina traduz, segundo VIDAL (1963b-

-1964a), a orientação molecular dos mucopolissacarídeos ácidos.

Os fundamentos deste fenômeno foram amplamente discutidos, pelo mesmo autor em outro trabalho VIDAL (1963, b), sendo interessante transcrever aqui um resumo do mesmo:

"Os radicais = NH dos grupos quinonodiminos estão ligados às moléculas de mucopolissacarídeos ácidos nos radicais aniônicos, de tal sorte, que a posição dos eletrons ressonantes das moléculas do corante absorvem um quantum de luz, saltando para níveis superiores de energia. Nesta posição os feixes de colágeno são perpendiculares ao plano de polarização da luz. As moléculas de mucopolissacarídeos ácidos são então paralelas às de colágeno, tendo as moléculas do corante em posição perpendicular ao substrato de mucopolissacarídeos, às quais estão ligadas. Os feixes de colágeno, nestas condições aparecem como dicróicos; ~~ora~~, o dicróísmo é um fenômeno devido à absorção seletiva da luz polarizada pelos eletrons ressonantes das moléculas do corante, o qual, por sua vez, se prende de maneira orientada às moléculas do substrato, revelando, assim, a ordenação molecular do substrato, que são os mucopolissacarídeos ácidos".

De acôrdo com êsse raciocínio, o dicróísmo dos feixes de colágeno expressa a ordenação molecular de mucopolissacarídeos ácidos; sendo que o seu desaparecimento vem demonstrar o desarranjo molecular dessas substâncias.

Os feixes de colágeno da gengiva normal, corados com azul de toluidina, apresentaram dicróísmo, demonstrando conseqüentemente que, nessas condições, os mucopolissacarídeos apresentam orientação no seu arranjo molecular. Por outro lado, nas gengivas inflamadas, observou-se que os feixes de

colágeno morfològicamente alterados (fragmentados, en-
tumescidos, com dissociação de fibras, etc.), conser-
vavam a metacromasia, porém, deixavam de apresentar o
dicroísmo, isto é, qualquer que fôsse a posição do cor-
te, em relação ao plano de polarização da luz, os fei-
xes de colágeno, assim alterados, mostravam sempre a
mesma tonalidade de côr, portanto não dicroicos.

A perda do dicroísmo, observada nos fei-
xes de colágeno modificados pela reação inflamatória,
vem revelar que os mucopolissacarídeos ácidos, neles
contidos, perderam a sua orientação molecular.

Já o dicroísmo observado nos feixes de co-
lágeno impregnados pela prata, não pode ter a mesma ex-
plicação daquele apresentado nas colorações com azul
de toluidina, ou seja, por fenômenos de absorção de
energia por eletrons ressonantes (VIDAL-1964b).

Sabe-se, hoje, que as micropartículas de
prata se depositam no interior dos feixes de colágeno
(WASSERMANN & KUBOTA-1956 e SCHWART in VIDAL-1964 b).
Isto permite, segundo VIDAL (1964b), supôr que o di-
croísmo, existente nos feixes de colágeno impregnados
pela prata, seja devido a uma orientação dos cristais
de prata pelos componentes dos feixes de colágeno (co-
lágeno mais elementos da substância fundamental). Ora,
em se sabendo que tanto as macromoléculas de colágeno
como as de mucopolissacarídeos são orientadas, em
qualquer dos componentes sôbre o qual se depositem os
cristais metálicos, êles serão induzidos a se orienta-
rem.

A ausência de dicroísmo, verificada nos
feixes de colágeno alterados pela inflamação e im-
pregnados pela prata, vem falar a favor de que os mi-
cro-cristais metálicos se depositam em íntima relação
com os mucopolissacarídeos ácidos, pois, êstes são os
primeiros elementos a sofrerem uma desorientação mole-
cular. Isto faz pensar que o dicroísmo pela prata te-

nha o mesmo significado que o do azul de toluidina, conclusão esta já obtida anteriormente (VIDAL, 1964b). A relação entre a impregnação pela prata e os mucopolissacarídeos ácidos parece, realmente, existir e, presentemente, está sendo objetivo de estudo do autor desta tese.

IV.3.2 - Birrefringência

A birrefringência existe devido à agregação de partículas submicroscópicas, com ordenação molecular, que em conjunto formam as cadeias polipeptídicas dos feixes de colágeno. Convém lembrar que 13% da birrefringência de forma do colágeno é devida à participação dos mucopolissacarídeos ácidos, fato inédito demonstrado por (VIDAL, 1964b).

A birrefringência, então, quando presente, indica a orientação macromolecular do componente protéico do colágeno. O desaparecimento total da birrefringência significa, então, a perda da orientação das moléculas proteicas, que constituem as cadeias polipeptídicas de colágeno. Por outro lado, a simples diminuição da birrefringência precisa ser relacionada com o desaparecimento do dicroísmo, visto que, esta diminuição pode ser devida, em parte, à desorientação dos mucopolissacarídeos ácidos.

Os resultados mostraram que, na área da reação inflamatória, os feixes de colágeno em início de desintegração (FC_1) apresentavam perda de dicroísmo e apenas uma diminuição da birrefringência. Isto vem revelar que os mucopolissacarídeos ácidos, responsáveis pelo dicroísmo e por parte da birrefringência, são menos estáveis que o colágeno, conclusão esta já emitida por ALBERTINI (1961) e por VIDAL (1964b).

A parte da birrefringência, que pode ser notada mesmo após a perda do dicroísmo, deve ser atribuída à cadeia polipeptídica do colágeno, que ainda permanece com ordenação molecular. Nos feixes de colágeno, em

estado mais avançado de desintegração (FC₂), notou-se a perda total da birrefringência, significando, então, a perda da orientação molecular das cadeias polipeptídicas do colágeno; fato êste, também observado por VIDAL (1964b), nas regiões de fragmentação de tendões - de cobaias.

Acredita-se, finalmente que a presente pesquisa traga informações de importância clínica, pois, mostra que nas gengivites exsudativo-vasculares ou infiltrativas predominam fenômenos inflamatórios destrutivos de longa duração, decorrentes da ação e peculiaridades dos agentes flogógenos, que tornam o "ambiente" bioquímico do local inflamado desfavorável à proliferação. Nestas condições, se não forem tomadas medidas terapêuticas adequadas, que eliminem os agentes flogógenos e criem condições para a proliferação e conseqüente cura, haverá uma contínua e progressiva perda de estruturas e a difusão da inflamação às estruturas periodontais mais profundas.

§
§§§§§
§

V - CONCLUSÕES

Em vista dos resultados fornecidos pelos métodos empregados pode-se tirar as seguintes conclusões:

1) No córion gengival existem os ácidos: hialurônico, condroitin sulfatos A ou C e B, siálico e heparina.

2) Estas substâncias, com exceção da heparina que existe nas granulações dos mastócitos, estão distribuídas junto aos feixes de colágeno, nas paredes vasculares, na substância fundamental e, também, na membrana basal.

3) Entre os mucopolissacarídeos presentes no córion gengival, o ácido hialurônico existe em maior quantidade.

4) Os mucopolissacarídeos ácidos sulfatados estão presentes principalmente nos feixes de colágeno, paredes vasculares e na membrana basal.

5) Nas estruturas do córion gengival, os mucopolissacarídeos ácidos participam com as proteínas e polissacarídeos neutros de um "edifício" macromolecular, onde existe uma perfeita interligação dos seus grupos polares.

6) O ponto iso-elétrico aparente dos componentes do córion gengival (feixes de colágeno/paredes vasculares + substância fundamental) é mais baixo na gengiva inflamada, demonstrando que a reação inflamatória provavelmente provoca modificações no complexo polissacarídeo/proteína.

7) Nas gengivites exsudativo-vasculares e infiltrativas ocorrem modificações das estruturas do córion gengival, com uma acentuada diminuição dos mucopolissacarídeos ácidos.

8) As paredes vasculares presentes na área da reação inflamatória, embora conservem suas ca

racterísticas histoquímicas, estão estruturalmente alteradas.

9) Os feixes de colágeno são destruídos gradativamente pela inflamação, ocorrendo, primeiramente, uma despolimerização e perda da orientação molecular dos mucopolissacarídeos ácidos (perdem o dicroísmo, mas conservam a birrefringência); posteriormente, ocorre também a desagregação das cadeias polipeptídicas de colágeno (perdem a birrefringência).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTINI, A. - Morphology and pathogenesis of fibronoide tissue damage in rheumatic granuloma. Ztschr. Rheumaforsch, 20: 1-16, 1961.
- ANNEROTH, G. - Autofluorescent granular cells in human gingiva. Acta Odont. Scandinava, 21: 453-461, 1963.
- ARNIM, S. S. & HAGERMAN, D. A. - The connective tissue fibres of the marginal gingiva. J.A.D.A. 47 (3): 271-281, sep., 1953.
- ASBOE-HANSEN, G. - Variability in the hyaluronic acid content of the dermal connective tissue under the influence of thyroid hormone. Acta Derm. Vener. 30: 221-230, 1950. Apud Hall, W.B. (1966), op. cit. p. 1325.
- _____ - Endocrine control of connective tissue. Am. J. Med. 26: 470-484, 1959.
- BALAZS, A. & HOLMGREN, H. S. - The basic dye uptake and the presence of a ground inhibiting substance in the healing tissue of skin wounds. Exp.Cell.Res. 1:206, 1950.
- BENATTI, O. - Doença periodontal inflamatória: Tipos e grau de severidade segundo a idade, condição econômica, frequência de escovação e índice de higiene oral. Relação com o grau de sensibilidade cutânea-vascular. Piracicaba, Faculdade de Odontologia da Universidade de Campinas, 1967 - Tese.
- BERNIER, J.L. - Tratamentos de las enfermedades orales. Bibliográfica Omeba S/A, Buenos Ayres, 1962.
- BOOY, H.L., DEIERKAUF, F.A. & HEGNAUER-VOGELENZANG, M. - Acta Physiol.Pharmac.Neerl., 3: 113, 1953. Apud Lison, L. (1960), op. cit. p. 293.

- BOOY, H.L. & LOEVEN, W.A. - Arch.Int.Physiol., 62: 552, 1954
 Apud Lison, L. (1960), op. cit. p. 293.
- BUNTING, H. - The distribution of acid mucopolysaccharides
 in mammalian tissues as revealed by histochemical me-
 thodes. Ann. N.Y. Acad.Sci., 52: 977, 1950.
- _____ & WITHE, R.F. - Histochemical studies of skin
 wounds in normal and scorbutic guinea pig. Arch.Path.
49: 4(0, 1950.
- BURTON, A.L. - Studies on living normal mast cells. Ann. N.
Y. Acad.Sci., 103: 245, 1963.
- CABRINI, R.L. & CARRANZA, F.A. - Estudio histoquímico de
 las substâncias "PAS" positivas, metacromática y ba-
 sófilas en los tejidos periodontales. Rev.Asoc.Odont.
Argent., 44: 309-315, 1956.
- _____ idem - Histochemistry of Periodontal tissues
 -A riview of the literature. International Dental Jour
nal, 16 (4): 466-479, Dec., 1966.
- CAMPANI, M. & REGGIANINI, O. - Observations in the experi-
 mental animal on the nature of the metachromatic gro-
 und substance in granulations tissue. J.Path.Bact.,
62: 563, 1950.
- CARRANZA, F.A. & CABRINI, R.L. - Mast cell in human gingiva.
Oral Surg., Oral Med. & Oral Path, 8: 1093-1099, 1955.
- CELLARIUS, Y. G. - The role af acid mucopolisaccharides in
 connective tissue during inflammatory and regenerati-
 ve processes. C.A. 58: 7228, 1963.
- COLONIUS, Von P.E.B. - Uher das aufterten von mastzellen im
 zahnfleisch im estraktionsharben und im bindegewebe
 unter kompressionen. Schweis. Msthr. Zahnheilk. 69: 448-
 497, 1959. Apud Hall, W.B. (1966), op. cit. p. 1325.
- COSTA, A.C. - Manual de técnica histológica - 3ª Ed. Livra-
ria Portulália. p. 215, 1943.

- DEITHC, A.C. - Lab. Invest., 4: 324-351, 1955. Apud Lison, L. (1960) op. cit. p. 326.
- DELAUNAY, A. & BAZIN, S. - Histo et biochemie des foyers inflammatoires in Histochemistry & Cytochemistry - - proceedings of the first international congress - - p. 369-430. The Macmillan Company - New York, 1963.
- DEWAR, M.R. - Observations on the composition and metabolism of normal and inflamed gingiva. J.Periodont. 26: 29-39, 1955.
- DIENSTEIN, B., RATCLIFF, P.A. & WILLIAMS, R.K. - Mast cell density and distribution in gingival biopsies: A quantitative study. J. Periodont., 38 (3): 198-203, may-june, 1967.
- DUMMETT, C.O., BOLDEN, T.E. & GOLDSBERRY, S. - Mast cell density. II. gingiva in periodontitis. J.Periodont., 34 (3): 281-284, may, 1963.
- DUNPHY, J.E. & UDUPA, K.N. - Chemical and histochemical sequences in the normal healing of wounds. New Engl.J. Med., 253 (20): 847-851, nov., 1955.
- ENGEL, M.B. - Water-soluble mucoproteins of the gingiva. J. dent.Res., 32 (6): 799, Dec., 1953.
- ENQUIST, I.F. & ADAMSONS, R.J. - Collagen synthesis and lysis in healing wounds. Minnesota Medicine, 48: 1695-1698, 1965.
- PASSKE, E., & MORGENROTH, K. - Examens stomatoscopiques et histochimiques comparatifs de la gengive marginale chez l'home. Paradentologie, 12: 151-160, 1958.
- FAVA DE MORAES, F. - Alguns dados morfológicos associados ao estudo histoquímico dos polissacarídeos em glândulas salivares de animais pertencentes às seguintes ordens: Marsupialia, Chiroptera, Primates, Edentata, Lagomorpha, Rodentia, Carnivora e Artiodactyla (Mam-

- malia). Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, 1964 - Tese.
- FERRIGNO, P.D. & BHUSSRY, B.R. - Histochemical aspects of gingival disturbances. J.dent.Res., 40 (4): 683, July-aug., 1961 - Abst.
- FISHER, E.R. & LILLIE, R.D. - The effect of methylation on basophilia. J.Histochem.Cytochem., 2: 81-87, 1954.
- FRAENKEL-CONRAT, H. & COOPER, M. - The use of keys for the determination of acid and basic groups in proteins. J.Biochem. 154: 239-246, 1944. Apud Morgan, R.E. -- (1964) op. cit. p. 246.
- FROM, S. H. & SCHYLTZ-HAUDT, S.D. - Comparative histological and microchemical evaluations of the collagen content of human gingiva. J.Periodont. 34 (3): 216, may, 1963.
- FUCKS, M. & CIECIURA, L. - Histologische und histochemische untersuchungen uber zellulare bestandteile der zahnfleisch-bindegewebe-infiltrationen in prozess parodontolyse. Paradontologie and Academy Review, 1 (1): : 45-52, mar., 1967.
- FULLMER, H. M. - Histochemical studies of the periodontium. J.dent.Res., 45: 469, may-june, 1966.
- _____ & GIBSON, W. - Colagenolytic activity in gingivae of man. Nature, 209: 728-729, Feb., 1966.
- GEBHARDT, D.O.E. - A bioquematical study on the development of collagen. Academish-Proefschrift. Amsterdam, 1960.
- GLICKMAN, I. - Clinical Periodontology - The periodontium: : health and disease - 2a Edition - Saunders, 1958.
- _____ & SMULOW, B. - Histopathology and histochemistry of chronic descamative gingivitis. Oral Surg., Oral Med. & Oral Path., 21: 325-332, 1966.

- GOLDMAN, H.M. - Histologic topographic changes of inflammatory origin in the gingival fibers. J. Periodont. 23: 104-108, 1952.
- _____, SCHLUGER, S., COHEN, S., CHAIKIN, B. & FOX, L. - PERIODONCIA - Parodontologia - 1ª Ed. Editorial Interamericana S/A, México, 1960.
- GOLTZ, R.W., FUSARO, R.M. & JARVIS, J. - The demonstration of acid substances in normal skin by alcyan blue. J. Invest. Derm. 31: 183-190, 1958.
- GRIES, G. & LINDNER, J.I. - Comparative studies on collagen degradation in inflammatory tissue, and tissue lathyrism. Med. Krin. 58 (52): 2147-2148, 1963.
- HALL, W.B. - Staining mast cells in human gingiva. Arch. Oral Biol., 11: 1325-1326, 1966.
- HEILMEYER, H.C.L. & KAHLER, H.J. - La inflamación: su regulación y tratamiento. Ediciones Toray, S/A. Barcelona, 1964.
- HIGGINBOTHAM, R.D., DOUGHERTY, R.F. & JEE, W.S.S. - Fate of shed mast cell granules. Proc.Soc.Exp.Biol.Med., 92: 256-261, 1956. Apud Hall, W.B. (1966), op. cit. p. 1325.
- HOUCK, J.C. & JACOB, R.A. - Connective tissue. II. Distant dermal collagen response to local inflammation. Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 106: 145-147, 1961a.
- _____ idem - The chemistry of local dermal inflammation. J. Invest. Derm. 36: 451-456, 1961b.
- _____ idem & VICKERS, K. - Dermal chemical changes with local inflammation and necrosis. Amer. J. Path. 40 (5): 531-543, 1962.
- HUDACK, S.S., BLUNT, J.W., HIGBEE, P. & KEARING, G.M. - A probable acid mucopolysaccharide present in granula

- tion tissue. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 72:526, 1949.
- IGNACIO, E. - Estudo citoquímico da granulação do mastócito. Ribeirão Preto, Faculdade de Farmácia e Odontologia. 1964 - Tese.
- JACKSON, D.S. - Chondroitin Sulphuric acid as a factor in the stability of tendon. Biochem. J. 54: 638-641, 1953.
- _____ - The formation and breakdown of connective tissue. In: connective tissue. Editado por R.E. Tumbridge, Blackwell, Oxford, 1957. Apud Morgan, R.E. (1965), op. cit. p. 245.
- KASSABIAN, S.S. - Histochemical characteristics of glycogen and of acid mucopolysaccharides in tuberculous nodules and exudative foci. Probl. Tuberk. 42 (1): : 69-73, 1964.
- KERR, D.A. & ASH, M.M. - Oral Pathology - An introduction to oral Pathology for hygienists. Lea & Feluger, Philadelphia, 1960.
- KRONFELD, R. & BOYLE, P.E. - Histopatologia dos dentes. 3ª Ed. Editora Científica - Rio de Janeiro, 1955.
- LANDSMEER, J.M.F. - Acta Pharmac. Neerl., 2: 112, 1951. Apud Lison, L. (1960), op. cit. p. 293.
- _____ & GIEL, R. Acta Pharm. Neerl., 4: 69, 1956. Apud Lison, L. (1960), op. cit. p. 293.
- LEPPI, T. J. & STOWARD, P.J. - On the use of testicular hyaluronidase for identifying acid mucins in tissue sections. J. Histochem. Cytochem., 13:406-407, may-june, 1965,
- LEV, R. & SPICER, S.S. - Specific staining of sulphate groups with alcian blue at low pH. J. Histochem. Cytochem., 12: 309, 1964.

- LIKAR, I.N., LIKAR, L.J. & ROBINSON, R.W. - Mast cells and hyaluronic acid in the bovine endometrium. Nature, 203: 730-733, aug., 1964.
- LILLIE, R.D. - Histopathologic technic and practical histochemistry - The Blakiston Division, p. 338, 1954.
- _____ - Acetylation and nitrosation of tissue amines in histochemistry. J.Histochem.Cytochem. 6: 352-362, sept., 1958.
- LISON, L. - Histochimie et Cytochimie Animales - Principes et Méthodes 3^{ème} éd. Paris, Gauthier - Villars, 2 v. p. 293, 325, 417, 419 e 745, 1960.
- LUCAS, R.B. & THONARD, J.C. - The action of oral bacteria on collagen. J.dent.Res., 34 (1):118-122, feb., 1955.
- MACDONALD, J.B., GIBBONS, R.J. & SOCRANSKY, S.S. - Bacterial mechanisms in periodontal disease. Ann. N. Y. Acad. Sci., 85: 467, 1960.
- Mc CLUNG'S HANDBOOK OF MICROSCOPICAL TECHNIQUE - 3d Ed., Hafner Publishing, Co., New York, 1961, p. 283.
- MC MANUS, J.F.A. - The histological demonstration of mucus after periodic acid. Nature, 158: 202, 1946.
- MELCHER, A.H. - The pathogenesis of chronic gingivitis I-The spread of the inflammatory process. Dent. Practit., 13 (1): 2-7, sept., 1962.
- _____ - The argyrophilic fibres in repair of chronically inflamed gingival connective tissue. Dent. Practit., 16: 129, 1965.
- MEYER, K. & RAPPORT, M. - The mucopolysaccharides of the ground substance of connective tissue. Science, 113: 596-599, 1951.
- MONTAGNA, W. - The structure and function of skin - Academic Press, New York, 1956.

- MORGAN, R.E. - An effect of inflammation on human gingiva collagen. J.Periodont., 36 (3):245-247, may-june, 1965.
- MOWRY, R.W. - 1960 - In MUNHOZ, C.O.G. - Estudo histoquímico comparativo (proteínas e carboidratos) das glândulas salivares maiores de três ordens de mamíferos (Artiodáctilos, carnívoros e roedores). Piracicaba, Faculdade de Odontologia da Universidade de Campinas 1967. Tese. p. 67.
- MUNHOZ, C.O.G. - Estudo histoquímico comparativo (proteínas e carboidratos) das glândulas salivares maiores de três ordens de mamíferos (artiodáctilos, carnívoros e roedores). Piracicaba, Faculdade de Odontologia da Universidade de Campinas. Tese, 1964.
- ORBAN, B., WENTZ, F.M., EVERETT, F.C. & GRANT, D.A. - PERIODONCIA - Paradontologia - 1ª Ed. Editôra Interamericana S/A - México, 1960.
- PEARSE, A.G.E. - Histochemistry: Theoretical and applied. 2nd ed., London, J. & A. Churchill Ltda., 1960.
- PEARSE, R.H. & WATSON, E.M. - The mucopolysaccharides of human skin. Canad. J. Res., 27: 43-57, 1949.
- PISCHINGER, A. - Zellf. 3: 169, 1926. Apud Lison, L.(1960) op. cit. p. 733.
- QUINTARELLI, G. - Histochemistry of the gingiva - IV- Preliminary investigations on the mucopolysaccharides of connective tissue. Arch. Oral Biol., 2: 277, 1960.
- _____ - Histochemical identification of salivary mucins. Ann. N.Y. Acad. Sci., 106:339-363, 1963.
- _____, TSUIKI, S., HASHIMOTO, Y. & PIGMAN, W. - Studies of sialic acid-containing mucins in bovine submaxillary and rat sublingual glands. J.Histochem. Cytochem., 9: 176-183, mar., 1961.

- RAY, H. & ORBAN, B.J. - Deep necrotic foci in the gingiva. J. Periodont., 19: 91, 1948.
- RIBBERT, H. & HAMPERL, H.- Tratado de Patologia General y Anatomia Patológica. Editorial Labor, S/A. 6a Ed. - 1956.
- RILEY, J.F. - Histamine and heparin in tissue mast cells: why both? Lancet., II: 40-41, 1962. Apud Hall, W.BB. (1966), op. cit. p. 1325.
- ROBBINS, S.L. - Patologia - Livraria Editôra Guanabara Koogan S/A, 1962.
- SAMS, W.M., SMITH, J.G. & DAVIDSON, E.A. - The connective tissue histochemistry of normal and some pathological skin. J.Histochem. Cytochem., 10: 710-718, nov., 1962.
- SAUNDERS, A.M. - Histochemical identification of mucopolysaccharides with acridin orange. J.Histochem.Cytochem. 12: 164-170, mar., 1964.
- SCHOEFL, G.I. - The acute inflammatory response. Electron microscopic observations on the regeneration of blood vessels after injury. Ann. N.Y. Acad.Sci., 116: 789-802, 1964.
- SCHULTZ-HAUDT, S.D. - Observations of the acid mucopolysaccharides of human gingiva. Odont. T. (supl. 1), 1958.
- _____ - Anatomy and physiology of the periodontal structures - Review of the literature - World Sorkshop in Periodontics. Ann.Arbor, Michigan, 1966.
- _____ - Observations on the acid mucopolysaccharides of human gingiva. Oslo.Univ. Press, 1957.
- _____ - & AAS, E. - Observations on the status of collagen in human gingiva. Arch. Oral Biol., 2: 131, 1960.
- _____ - BIBBY, B.G. & BRUCE, M.A. - Tissue

- destructive products of gingival bacteria. J.dent. Res., 33: 624, 1954.
- SCHULTZ-HAUDT, S.D., FROM, S. HJ. & NORDBO, H. Histochemical staining properties of isolated polysaccharide components of human gingiva. Arch. Oral Biol., 9: 17-25, 1964.
- _____, PAUS, S. & ASSEV, S. - Periodic acid-schiff reactive components of human gingiva. J.dent.Res., 40 (1): 141-147, jan.-feb., 1961.
- _____ & SCHERP, H.W. - Production of hyaluronidase and beta-glucuronidase by viridans streptococci isolated from gingival crevices. J.dent.Res. 34 (6): 924-929, dec., 1955a.
- _____ idem - Lysis of collagen by human gingival bacteria. Proc.Soc.Exper.Biol.Med., 89 : : 697, 1955b.
- _____ idem - The production of chondrosulfatase by microorganism isolated from human gingival crevices. J.dent.Res., 35 (2): 299, ap., 1956.
- SOLOMONS, C.C. - Reaction of Orange G - with bone and dentin collagen. J.dent.Res., 37 (5): 982-983, sep.-oct., 1958.
- SPICER, S.S. & LILLIE, R.D. - Saponification as a means of selectively reversing the methylation blockade of tissue basophilia. J.Histochem. Cytochem., 7: : 123-125, mar., 1959.
- _____ & DUVENCI, J. - Histochemical characteristics of mucopolysaccharides in salivary and orbital lacrimal glands. Anat.Rec., 149 (3): 333-358, jul., 1964.
- _____ & WARREN, L. - The histochemistry of sialic acid containing mucoproteins. J.Histochem. Cy-

- tochem., 8: 135-137, mar., 1960.
- STAHL, S.S., SANDLER, H. & SUBEN, E. - Histochemical changes in inflammatory periodontal disease. J.Periodont. 29 (3): 183-191, jul., 1958.
- STEIN, O. & WOLMAN, M.A. - A histochemical study of wound healing in scorbutic Guinea pigs. Brit.J.Exp.Path. 39: 418, 1958.
- STELLA, A. - Mast cells in human gingiva. Dent.Abst., 2: 142, mar., 1957.
- STONES, H.H., FARMER, E.D. & LAWTON, F.E. - Oral and Dental Diseases - W. & S. Livingstone Ltd. Edinburgh and London, 4th Ed., 1962.
- TERNER, C. - Histological categories of the clinically healthy gingiva. J.Periodont., 38 (3):211-217, may-june, 1967.
- THILANDER, H. - The effect of leukocytic enzyme activity on the structure of the gingival pocket epithelium in man. Acta Odont. Scand., 21: 431, 1963.
- THONARD, J.C. & BLUSTEIN, R. - Sialic acid in human gingiva., J.dent.Res., 44: 379-382, 1965.
- TODORO, F. - Ueber mastzellen und ihre aussagen. Wien.Klin.Wchnschr., 64: 411-415, 1938. Apud Hall, W.B. (1966) op. cit. p. 1325.
- TOTO, P.D., POLLOCK, R.J. & GARGIULO, A.W. - Pathogenesis of periodontitis. Periodontics, 2: 179, 1964.
- TRIFTSHAUSER, C. - Studies of collagenase activity in periodontal diseases. Oral Res.Abst., 2 (12):1080, dec. 1967.
- TURESKY, S., GLICKMAN, I. & LITWIN, T. - A histochemical evaluation of normal and inflamed human gingivae. J.dent.Res., 30: 792-797, 1951.

- VALDRIGHI, L., VIZIOLI, M.R. & FERNANDES, C. - Classificação clínico-histopatológica de gengivites. R. Biol. Oral, IV: 8-17, 1966.
- VIDAL, B.C. - Histochemistry of the dental granuloma. Am. Histochem., 8: 35-42, 1963a.
- _____ - Pleocloism in tendon and its bearing to acid mucopolysaccharides - Protoplasma, 56: 529-536, 1963b.
- _____ - The part played by the mucopolysaccharides in the form birefringence of the collagen. Protoplasma, 59: 472-479, 1964a.
- _____ - Sobre a organização dos mucopolissacarídeos ácidos em tendões calcaneares de cobaia - Piracicaba, Faculdade de Odontologia da Universidade de Campinas, 1964b - Tese.
- _____ & BENATTI, O. - Mecanismo biológico na formação das bolsas periodontais. R. Biol. Oral, 1: 24-34, 1963.
- VIKHERT, A.M., KOGOI, T.F. & CHEKAREVA, G.A. - Organization of homologous fibrin transplanted on the serous membranes. Experimental morphological investigation. Excerpta Medica 16 (1): 408, 1963.
- VIZIOLI, M.R. & FERNANDES, C. - Gengiva humana: estudo de morfologia em microscopia de fluorescência. R. Biol. Oral, II: 1-13, 1965.
- _____ & VIDAL, B.C. - Coriphosphin in histochemistry of acid mucopolysaccharides. R. Biol. Oral, 4: 40-49, 1966.
- WALTON, K.W. & RICKETTS, C.R. - Investigation of the histochemical basis of metachromasia. J. Path. Bact., 35: 227-240, 1954. Apud Quintarelli, G. (1960), op. cit. p. 278.

WASSERMANN, F. & KUBOTA, L. - Observations on fibrillogenesis in the connective tissue of the chick embryo with the aid of silver impregnation. J. Bioph. Biochem. Cytol., 2: 67-70, 1956.

ZWEIFACH, B.W. - An analysis of the inflammatory reaction through the response of the terminal vascular bed to micro-trauma, in: The mechanism of inflammation. Acta Inc., Medical Publishers, Montreal 1953, Apud Heilmeyer & Kähler (1964), op. cit. p. 1.

DOCUMENTAÇÃO FOTOGRAFICA

(Ver páginas seguintes)

Fig. 1

Fig. 1 - Gengiva inflamada - Aspecto histopatológico. Note-se a substituição das estruturas normais do córion gengival, pelo exsudato e infiltrado celular inflamatórios e, também, áreas de necrose. Hematoxilina-Eosina - 6,3 X 1,25 X 3,2.

Fig. 2

Fig. 2 - Gengiva inflamada - Aspecto histopatológico: edema, grande número de neutrófilos, linfócitos, restos nucleares, vasos dilatados e alguns fibroblastos e células mesenquimais. Hematoxilina-Eosina - 16 x 1,25 x 3,2.

Fig. 3

Fig. 3 - Gengiva inflamada - Aspecto histopatológico: edema, vasos dilatados e hiperemiados, marginação leucocitária, grande número de plasmócitos e linfócitos; alguns neutrófilos, fibroblastos e células mesenquimais. Hematoxilina-Eosina - 16 x 1,25x3,2.

Fig. 4

Fig. 4 - Gengiva inflamada - Aspecto histopatológico: edema, infiltração celular, vasos dilatados, hiperemiados e trombosados. Hematoxilina-Eosina - LM* 550 mu** - 6,3 x 1,25 x 3,2.

* = Luz monocromática

** = Milimícrons

Fig. 5

Fig. 5 - Gengiva inflamada - Aspecto histopatológico, mostrando, na área de exsudação e infiltração celular, a presença de vasos neo-formados. Hematoxilina-Eosina - 40 x 1,25 x 3,2.

Fig. 6

Fig. 6 - Gengiva inflamada: vasos trombosados, com massas trombóticas calcificadas e em vias de calcificação. A.T.* pH 4,0; LM 560 mu; 450 X.

Fig. 7

Fig. 7 - Gengiva inflamada: feixes de colágeno com os primeiros sinais de desintegração pelo fenômeno inflamatório. Note-se o intumescimento dos feixes, dissociação e intumescimento das fibras e perda da ondulação. A.T. pH 5,0; LM 550 mu; 450 X.

Fig. 8

Fig. 8 - Gengiva inflamada: feixes de colágeno em estado avançado de desintegração. Observe-se que eles perdem suas características morfológicas e adquirem aspecto de massa grumosa e amorfa. A.T. pH 5,0; LM 550 mu; 450 X.

Fig. 9

Fig. 10

Fig. 9 - Gengiva inflamada - Aspecto morfológico. Note-se a maior evidência das fibras reticulares nas áreas onde houve o desaparecimento das fibras colágenas. Impregnação pela prata (GORDON & SWEET, 1936); LM 560 mu; 450 X.

Fig. 10 - Gengiva inflamada - Aspecto histopatológico; paredes vasculares dilatadas e em desintegração, marginação e diapedese de leucócitos. Note-se também que a parede vascular não mantém continuidade estrutural com o tecido conjuntivo adjacente. Tricrômico de Mallory - 450 X.

Fig. 11

Fig. 12

Fig. 11 - Gengiva inflamada - Observe-se que as paredes vasculares se apresentam estruturalmente alteradas, porém conservam-se metacromáticas. A.T. pH 4,0; LM 560 mu; 450 X.

Fig. 12 - Gengiva inflamada - Idem a figura 11. A.T. pH 5,0; (outra área). LM 560 mu; 450 X.

Fig. 13

Fig. 14

Figs. 13 e 14 - Gengiva inflamada - Observe-se, uma vez mais, as paredes vasculares morfologicamente alteradas, sem continuidade estrutural com o tecido conjuntivo adjacente, porém bem metacromáticas. A.T. pH 5,0; LM 590 mu, fonte ultravioleta; objetiva de imersão.

Fig. 15

Fig. 16

Fig. 15 - Gengiva inflamada - Aspecto histoquímico: positividade das paredes vasculares à coloração pelo azul de Alcian. Azul de Alcian pH 2,5; LM 580 mu; 100 X.

Fig. 16 - Gengiva inflamada - Aspecto histoquímico. Observe-se que, na área da inflamação, as paredes vasculares conservam também a coloração pelo orange G. Coloração: orange G pH 1,7; LM 530 mu; 100 X.

Fig. 17

Fig. 17 - Gengiva inflamada: grande número de mastócitos que aparecem, em alguns casos, nas adjacências do local intensamente inflamado. Fluorescência pela Corifosfina pH 4,5; 450 X.

Fig. 18

Fig. 18 - Gengiva inflamada. Observe-se que os grânulos citoplasmáticos dos mastócitos são liberados e se distribuem ao longo das fibras de colágeno e paredes vasculares. Fluorescência pela Corifosfina pH 4,5; objetiva de imersão.

Fig. 19

Fig. 19 - Gengiva normal - Basofilia metacromática do córion gengival. A.T. pH 5,0; LM 550 μ ; 100 X.

Fig. 20

Fig. 20 - Gengiva normal - Basofilia metacromática (A.T. pH 3,5). Note-se que os feixes de colágeno e as paredes vasculares apresentam coloração metacromática, porém muito fraca. LM 550 μ ; 100 X.

Fig. 21

Fig. 21 - Gengiva normal - Basofilia metacromática (A.T. pH 4,0) após o tratamento da metilação mais a saponificação, mostrando o retorno da metacromasia. LM 560 mu; 100 X.

Fig. 22

Fig. 22 - Gengiva normal - Basofilia metacromática (A.T. pH 5,0) após p tratamento pela hialuronidase testicular. LM 560 mu; 100X.

Fig. 23

Fig. 23 - Gengiva normal - Coloração pelo azul de Alcian ao pH 2,5. Note-se a forte positividade em todo o córion gengival. LM 560 mu; 100 X.

Fig. 24

Fig. 24 - Gengiva normal - Coloração pelo azul de Alcian ao pH 1,0. Observe-se a fraca coloração distribuída junto aos feixes de colágeno e paredes vasculares. LM 570 mu; 100 X.

Fig. 25

Fig. 25 - Gengiva normal - Acidofilia total pelo orange G. Verifique-se a forte positividade da coloração especialmente junto aos feixes de colágeno e paredes vasculares. Orange G pH 1,7; LM 530 μ ; 100 X.

Fig. 26

Fig. 26 - Gengiva normal - Acidofilia total pelo orange G (pH 1,7) após a desaminação pelo ácido nitroso. LM 520 μ ; 100 X.

Fig. 27

Fig. 27 - Gengiva normal - (A.T. pH 5,0) Exame feito em microscópio de polarização, para observação do dicroísmo. Feixes de colágeno em posição paralela ao plano de polarização da luz; nestas condições eles adquirem uma coloração tendente para azulada (mais clara). LM 530 μ ; 100 X.

Fig. 28

Fig. 28 - Idem à fig. 27, com os feixes de colágeno em posição perpendicular ao plano de polarização da luz; nestas condições, os feixes adquirem uma coloração bem avermelhada (mais escura).

Fig. 29

Fig. 29 - Gengiva normal - (A.T. pH 5,0) Exame feito em microscópio de polarização, para observação do dicroísmo. Feixes de colágeno em posição paralela ao plano de polarização da luz exibem uma coloração tendente para azulada (mais clara). LM 550 μ ; 450 X.

Fig. 30

Fig. 30 - Idem à fig. 29, com os feixes de colágeno colocados em posição perpendicular ao plano de polarização da luz; nestas condições, eles apresentam uma coloração bem avermelhada (mais escura).

Fig. 31

Fig. 31 - Gengiva normal - Impregnação pela prata. Exame feito em microscópio de polarização para a verificação do dicroísmo. Os feixes de colágeno colocados em posição paralela ao plano de polarização da luz, adquirem uma coloração castanho escura. LM 560 μ ; 450 X.

Fig. 32

Fig. 32 - Idem a fig. 31, com os feixes de colágeno em posição perpendicular ao plano de polarização da luz; nestas condições eles adquirem uma coloração castanho clara.

Fig. 33

Fig. 34

Figs. 33 e 34 - Gengiva normal - Impregnação pela prata. Exame feito em microscópio de polarização para verificação do dicroísmo. Nestas fotomicrografias existem, ao mesmo tempo, feixes de colágeno paralelos e perpendiculares ao plano de polarização da luz. Observar na fig. 33, em a, feixes paralelos ao plano de polarização e, em b feixes perpendiculares a êsse plano. O inverso pode ser notado na fig. 34. isto é, em a feixes perpendiculares e em b feixes paralelos (note-se a inversão da tonalidade de cor). LM 560 mu; 450 X.

Fig. 35

Fig. 36

Figs. 35 e 36 - Gengiva inflamada - (A.T. pH 5,0) Exames feitos em microscópio de polarização para a verificação do dicroísmo. Observe-se que os feixes de colágeno, em ambas as posições, paralelas (fig. 35) e perpendicular (fig. 36) ao plano de polarização da luz, não apresentam modificação alguma na coloração - (perda do dicroísmo), indicando que os mucopolissacarídeos ácidos perderam a orientação molecular. LM 550 mu; 450 X.

Fig. 37

Fig. 38

Figs. 37 e 38 - Gengiva inflamada - (A.T. pH 4,0) Exames feitos em microscópio de polarização para a verificação do dicróismo. Verifique-se que em quaisquer das posições (paralela na fig. 37 e perpendicular na fig. 38) em que forem colocados os feixes de colágeno, em relação ao plano de polarização da luz, não apresentam modificação alguma na coloração (perda do dicróismo). 40x1,25x3,2.

Fig. 39

Fig. 40

Figs. 39 e 40 - Gengiva inflamada - Impregnação pela prata. Exames feitos em microscópio de polarização, para a verificação do dicróismo. Note-se que em quaisquer das posições (paralela na figura 39 e perpendicular na figura 40) em que forem colocados os feixes de colágeno em relação ao plano de polarização da luz, não se verifica mudança alguma na coloração (perda do dicróismo), significando que houve perda na orientação molecular dos mucopolissacarídeos ácidos. LM 560 mu; 450 X.

Fig. 41

Fig. 41 - Gengiva normal - Exame feito em microscópio de polarização para a verificação da birrefringência. Observe-se que os feixes de colágeno normal apresentam-se bem birrefringentes. 40x1,25x3,2.

Fig. 42

Fig. 42 - Gengiva inflamada - Exame feito em microscópio de polarização. Observe-se a fraca birrefringência apresentada pelos feixes de colágeno alterados pelo fenômeno inflamatório. 40x1,25x3,2.

§
§ §
§