

Réplicas vasculares da língua de ratos *Wistar* com resina Mercor[®] – implicações da corrosão

Vascular corrosion casts with Mercor[®] resin of the rats Wistar tongues – implications of the corrosion

Leo Kraether Neto *

Maristela Gutiérrez de Borba **

Maria Antonieta Lopes de Souza ***

Antônio Generoso Severino****

Resumo

O método de corrosão vascular com resina Mercor-CI-2B[®] para visualização sob microscopia eletrônica de varredura (MEV) permite que se realize uma análise da angioarquitetura. Para tanto, há necessidade de maceração parcial ou total do tecido orgânico que se encontra ao redor do molde. Com relação à corrosão, cada órgão a ser analisado apresenta especificidades técnicas, vinculadas ao tamanho e ao tipo de tecido que forma o espécime. Há necessidade de se eliminarem duas camadas na superfície dorsal da língua de ratos antes de expor o molde com resina. Existem poucos protocolos padronizados com relação à maceração de línguas. Dessa forma, neste trabalho foram utilizados nove ratos machos Wistar adultos, com dois meses de idade e aproximadamente 200g de peso, manipulados sob anestesia intraperitoneal para realização da técnica de réplica vascular com resina acrílica. A partir daí, três línguas foram maceradas com concentrações de hidróxido de sódio (NaOH) a 1, 10 e 20%, com temperatura padronizada em 45 °C, por 10, 24 e 36h, respectivamente. Todos os moldes obtidos foram submetidos à secagem pelo ponto-crítico e colocados em suportes metálicos para

metalização com duas camadas de carbono, seguidas por uma camada de ouro. Quando utilizadas soluções a 10 e 20% para maceração, foi possível notar a formação de estruturas que dificultam esse processo, assim como depósitos sobre as amostras, tornando-as extremamente sujas. Um período de 24 e 36 horas é necessário para remoção da ceratina da superfície dorsal da língua de ratos com solução de NaOH a 1% nas condições deste estudo.

Palavras-chave: moldes de corrosão, resina Mercor[®], língua, vascularização.

Introdução

A vascularização contribui tanto para o desenvolvimento como para a manutenção dos diferentes órgãos e tecidos, sendo inúmeras as metodologias empregadas para a avaliação e descrição da vasculatura. Uma dessas metodologias de análise da arquitetura vascular é a infusão de resinas de baixa viscosidade, como a Mercor-CI-2B[®] (LADD, Research Industries, Vermont, USA), dentro do sistema vascular para posterior visualização sob microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para tanto, há necessidade de se promover a maceração do tecido orgânico, ou seja, corroer total ou parcialmente o tecido mole e/ou duro ao redor do molde. Obtém-se desse modo uma réplica da forma e da densidade vascular.

Aharinejad e Lametschwandner¹ (1992) reportam historicamente o método de perfusão e

* Aluno do Programa de Doutorado em Estomatologia Clínica da PUCRS; professor do curso de Odontologia da Unisc/RS.

** Doutora em Estomatologia Clínica pela PUCRS; professora de Endodontia da PUCRS.

*** Professora do Programa de Doutorado em Estomatologia Clínica da PUCRS.

**** Biólogo responsável pelo Laboratório de Neuroanatomia da UFRGS.

Recebido: 27.07.2005 Aceito: 18.10.2005

corrosão numa era “pré-corrosão” (1521-1668), quando eram utilizados materiais não sólidos (infusão de ar, de fluidos não coloridos: a água, ou fluidos coloridos: o leite, tintas, cerveja e vinho) e também materiais sólidos (cera sólida, resina natural, gesso ou gelatina). A partir do ano de 1725, considera-se iniciada a “era de corrosão” pois, em razão da fragilidade dos materiais para modelagem e do efeito das substâncias corrosivas, buscaram-se materiais alternativos mais resistentes.

No século XX, principalmente nas décadas de 1970 e 1980, foram introduzidas com sucesso as resinas polimerizáveis a base de acrilato¹. Em 1971, Murakami foi o primeiro a realizar estudos morfológicos descritivos bem-sucedidos em vasos sanguíneos arteriais e venosos, e Kobayashi no sistema linfático¹. Hossler e Douglas² (2001) e Konering³ (1991) enfatizam que as réplicas vasculares têm sido utilizadas nos últimos quarenta anos com grande aplicação prática no que se refere à medicina, pois possibilitam a descrição da angioarquitetura tecidual.

Qualquer órgão pode ser estudado por meio dessa metodologia, sempre respeitando requisitos técnicos individuais. A língua, por ser um músculo que requer uma vascularização peculiar em relação aos demais pois atua tanto na mastigação como na deglutição, têm sido alvo de análise em MEV⁴⁻¹¹, em pesquisas que simularam réplicas em situação fisiológica.

Para que se obtenham boas réplicas com essa metodologia, há necessidade de dominá-la, pois nas diversas fases da técnica existe possibilidade de falhas. Dessa forma, o objetivo deste trabalho é contribuir com o método de réplicas vasculares utilizando a resina Mercor[®] na língua de ratos *Wistar*.

Materiais e método

Os animais utilizados neste estudo fazem parte do projeto piloto de uma tese de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Estomatologia Clínica da PUCRS. O projeto foi analisado pela Comis-

são Científica e Ética do curso de Odontologia da instituição e obteve parecer favorável. Foram utilizados nove ratos machos *Wistar* adultos, com dois meses de idade e aproximadamente 200g de massa corporal, provenientes da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde. Os animais foram manipulados sob anestesia intraperitoneal com quetamina e xilasina, dessa forma respeitando-se os preceitos éticos da pesquisa com animais (manipulação de forma indolor).

Uma vez anestesiados, os roedores foram fixados numa mesa operatória em decúbito dorsal, para promover-se a incisão linear no seu ventre. Dissecou-se a musculatura da parede abdominal para vislumbrar o músculo diafragma, que separa a cavidade abdominal da torácica; com tesoura romba, rompeu-se este músculo possibilitando acesso ao espaço cardíaco e aos vasos da base. Nesse momento injetou-se heparina no ventrículo esquerdo, na proporção de 20 UI para cada 100g do animal. Retirou-se o timo, localizado sobre os vasos da base do coração, e individualizaram-se os seguintes vasos: artérias subclávias direita e esquerda e aorta ascendente. A artéria aorta ascendente foi individualizada por intermédio de reparo com fio de seda 3-0, e as artérias subclávias foram ligadas por meio de cliques neurocirúrgicos. O ventrículo esquerdo foi incisado, permitindo que um catéter de oxigênio nº 6 fosse introduzido e orientado até chegar à artéria aorta ascendente. Pela mudança de coloração, verificou-se a passagem desse tubo pela artéria, e o fio de seda, previamente utilizado para individualizar a artéria, recebeu um nó para fixar o catéter intravascularmente. Simultaneamente, a artéria aorta descendente foi pinçada com *cryle*, para interromper o fluxo sanguíneo para a região inferior do corpo do animal, e o átrio direito foi incisado, para que todas as soluções, tanto de lavagem como de perfusão e a resina, pudessem extravasar por essa abertura. Sessenta mL de solução tampão fosfato a 0,2 M e pH 7,4, à temperatura de 37 °C sob pressão manual, foram

infundidos pelo catéter até que os olhos do animal apresentassem palidez, indicando esvaziamento completo de sangue no segmento cervicocefálico. Pelo menos 50 mL de paraformolaldeído a 4% foram injetados logo após, para facilitar a fixação dos vasos, e nova lavagem com 60 mL de tampão fosfato foi realizada. Assim, a arquitetura vascular foi considerada adequada para receber a resina.

Como material para modelagem utilizou-se resina acrílica líquida, cujo nome comercial é Mercor-Cl-2B[®]. Cinco mL da referida resina foram manipulados conforme especificações do fabricante e aplicados sob pressão manual em seringa descartável de 10 mL, através do catéter previamente instalado para as lavagens, até saída parcial pelo átrio direito.

A sequência de preparação dos espécimes deu-se pela separação da cabeça do rato do restante do corpo, com descarte desta porção, conforme rotina do laboratório de neuroanatomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Três línguas foram maceradas com concentrações NaOH a 1, 10 e 20% a 45 °C por 10, 24 e 36h, respectivamente, com troca da solução a cada 8h. Todos os moldes obtidos então foram desidratados com banhos de concentração progressiva de etanol, submetidos à secagem pelo ponto crítico (CPD) e colocados em suportes metálicos com a parte ventral voltada para baixo e fixa por fita dupla face (Fig. 1).



Figura 1 - Molde vascular fixo sobre suporte de alumínio com fita dupla face antes da metalização

A metalização foi realizada por meio da aplicação de duas camadas de carbono, seguidas por uma camada de ouro. A análise em MEV foi realizada no Centro de Microscopia e Microanálise da PUCRS.

Resultados e discussão

A obtenção de moldes vasculares em resina pela técnica de corrosão com posterior análise em MEV é bastante trabalhosa e peculiar, pois apresenta diversas fases de execução, as quais possuem implicação direta no resultado final. Com relação à corrosão, cada órgão a ser analisado apresenta especificidades técnicas, vinculadas ao tamanho e ao tipo de tecido que o forma. Na língua de ratos Wistar, a fase de corrosão é crítica, pois há necessidade de serem eliminadas duas camadas na superfície dorsal antes de expor o molde com resina (Fig. 2). A camada mais externa demonstra a grande ceratinização do epitélio, uma vez que, evolutivamente, a língua dos roedores correlaciona esta característica com o tipo de alimentação desses animais¹².

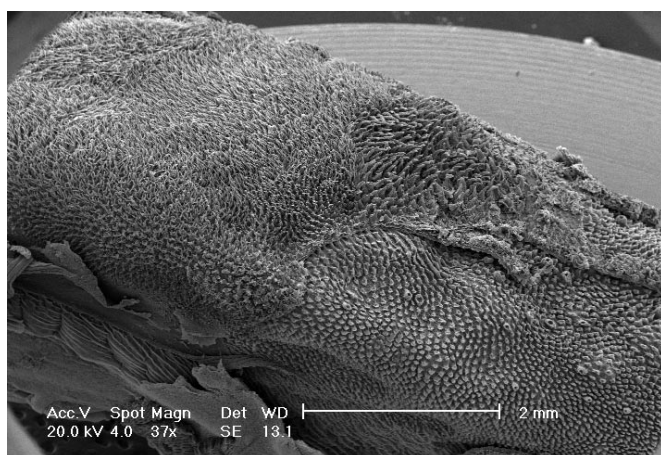


Figura 2 - Eletrofotomicrografia do dorso da língua de ratos Wistar com 10h de corrosão com NaOH 1%

Existem poucos protocolos padronizados com relação à maceração dos espécimes¹³. Difícilmente é possível reproduzir os estudos publicados na literatura com base na descrição da sua metodologia, pois faltam dados importantes. Não há uma regra para procedimentos de corrosão e a literatura não é consistente nesse aspecto¹⁴. Genericamente, é descrita uma proposta para corrosão, que pode ser feita com NaOH (10 a 30%) ou KOH (10 a 40%); o tempo de ação dessas substâncias varia de 2h a três semanas, dependendo do tamanho da amostra. Ohshima et al.⁴ (1990), trabalhando com línguas, utilizaram como substância para maceração a solução de KOH a 20%, a 60 °C, por 24-48h e Selliseth e Selvig⁶ (1993) utilizaram KOH a 15%, a 50 °C, por 15-20h. Makiyama et al.⁹ (1998) corroeram os tecidos moles da língua com NaOH a 20% por quatro dias em temperatura ambiente, sendo a mistura renovada duas vezes ao dia. Motoyama e Watanabe¹⁰ (2001) utilizaram NaOH na concentração de 10%, por cinco dias, à temperatura ambiente. Diante disso, fica evidente que não há padronização nas informações a respeito das seguintes variáveis envolvidas na maceração: substância corrosiva, temperatura e tempo.

Neste estudo outro problema diretamente relacionado à maceração dos tecidos moles foi a formação de estruturas resistentes à corrosão com aparência de tecido mole (massa gelatinosa translúcida que mostra-

va brilho superficial quando analisada à lupa estereoscópica), quando utilizados NaOH a 10 ou 20% (Fig. 3). Sims e Albrecht¹³ (1993), os únicos a descrever a saponificação da gordura e a agregação de estruturas micelares como responsáveis pela formação dessas massas resistentes à corrosão, explicaram que os hidróxidos com concentrações acima de 2% têm força iônica elevada, o que facilita a agregação de micelas.

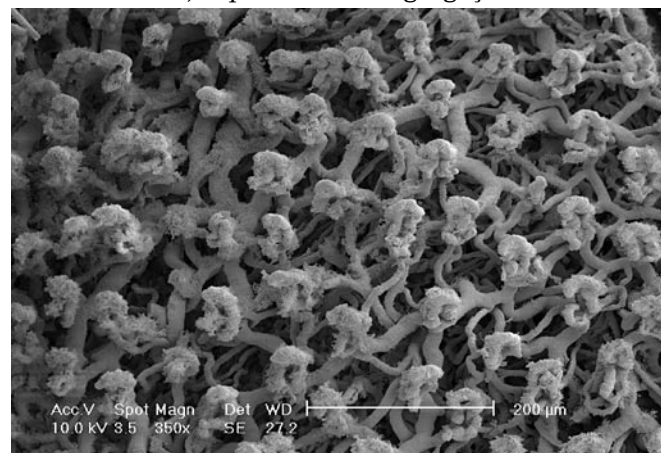


Figura 3 - Eletrofotomicrografia da vascularização das papilas filiformes cônicas simples do dorso da língua de ratos Wistar com deposição de estruturas micelares após maceração com NaOH 20% durante 36h

Assim, o uso da solução de NaOH a 1% em água deionizada, conforme proposto na metodologia deste estudo, foi a melhor opção, resultando numa maceração sem depósito (Fig. 4).

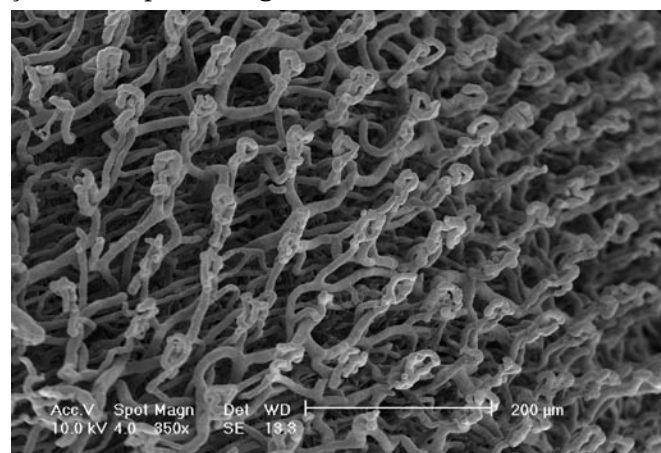


Figura 4 - Eletrofotomicrografia da vascularização das papilas filiformes cônicas simples do dorso da língua de ratos Wistar após maceração com NaOH 1% durante 36h

Como forma de padronização entre as diversas concentrações das substâncias corrosivas utilizadas neste estudo, foram realizadas trocas da solução a cada 8h¹³. Diante disso, é possível afirmar que não se obtém uma corrosão dos tecidos de forma mais rápida com concentrações maiores de hidróxidos. Hodde et al.¹⁴ (1990) citam que o NaOH a 40% promoveu uma mínima corrosão dos tecidos, talvez em virtude da saponificação, e que as concentrações de 5 a 10% tiveram praticamente a mesma eficácia que as concentrações mais elevadas. A elevação da temperatura das soluções de corrosão foi mais positiva do que propriamente a utilização de concentrações maiores afim de se obter maceração completa dos tecidos orgânicos da língua.

Conclusões

Em associação à MEV, a aplicação primária do método de corrosão vascular é utilizada para descrição morfológica e anatômica da distribuição da vascularização no interior dos tecidos. Diferentes tecidos, dependendo de sua composição, necessitam de processamentos individualizados, especialmente se apresentarem excesso de gordura, pois durante a corrosão podem ser depositadas nas amostras estruturas que dificultam o processamento para visualização em MEV, como foi o caso da línguas dos ratos Wistar. Assim, a dificuldade em serem obtidos bons moldes com a técnica de corrosão está diretamente relacionada ao processamento tecidual. A remoção da camada de queratina que está sobre a superfície dorsal da língua de ratos Wistar ocorre entre 24 e 36h após iniciada a maceração, independente da concentração de NaOH utilizada. É importante que se certifique que toda essa camada saia durante as lavagens intermediárias, caso contrário, o período de corrosão pode aumentar muito, não permitindo avaliação da vascularização em MEV. O uso de NaOH a 1% não promove a deposição de micelas sobre as réplicas, permitindo a tomada de boas imagens.

Abstract

The vascular corrosion cast with resin MercorTM-CL-2B for visualization under scanning electron microscopy (SEM) it allows the analysis of the angioarchitecture. For in such a way it has necessity of partial or total maceration of the organic tissue around of the mold. With relation to the corrosion, each organ to be analyzed presents individual techniques, entailed to the size and the type of the tissue that the specimen forms. In the rats tongues it has necessity to eliminate two layers in the dorsal surface, before displaying the vascular cast with resin. Few standardized protocols with relation to the maceration of tongues exist. Of this form, 9 male rats Wistar had been used, adults, with 2 months of age and approximately 200g of weight, manipulated under intraperitoneally anesthesia for accomplishment of the technique of vascular corrosion cast. From there, 3 tongues had been macerated with concentrations of NaOH the 1, 10 and 20%, respectively, with standardized temperature in 45 °C, for 10, 24 and 36 hours. All the gotten molds from now on, had been submitted to the drying for the point-critical and placed in metallic stubs, for sputtering with two carbon layers, followed for a gold layer. When used solutions of 10 and 20% for maceration, it was possible to surprise the formation of structures that make it difficult this process, as well as deposits on the specimens, of form that these are extremely dirty. The period between 24 and 36 hours is necessary for removal of the keratin of the dorsal surface of the tongue of rats with solution of sodium hydroxide 1% in the conditions of this study.

Key words: vascular corrosion cast, MercorTM resin, tongues, vascularization.

Referências

1. Aharinejad SH, Lametschwandtner A. Microvascular Corrosion Casting in Scanning Electron Microscopy. Germany: Springer-Verlag; 1992.
2. Hossler FE, Douglas JE. Vascular Corrosion Casting: Review of Advantages and Limitations in the Application of Some Simple Quantitative Methods. Microsc Microanal 2001; 7(30):253-64.
3. Konerding MA. Scanning electron microscopy of corrosion casting in Medicine. Scanning Microscopy 1991; 5(3):851-65.
4. Ohshima H, Yoshida S, Kobayashi S. Blood vascular architecture of the rat lingual papillae with special reference to their relations to the connective tissue papillae and surface structures: a light and scanning electron microscope study. Acta Anat 1990; 137:213-21.
5. Yu QX, Ran W, Pang KM, Philipsen HP, Theilade J, Chen XH et al. The microvasculature of human oral mucosa using vascular corrosion casts and ink injection. I. Tongue papillae. Scand J Microsc 1992; 6(1):255-62.
6. Selliseth NJ, Selvig KA. Microvasculature of the dorsum of the rat tongue: a scanning electron microscopic study using corrosion casts. Scand J Dent Res 1993; 101(6):391-7.
7. Selliseth NJ, Olsen HC, Selvig KA. Effect of specimen preparation method on relative volume of the microvasculature – a light microscopy study in rat tongue. Eur J Oral Sci 1995; 103:242-6.
8. Okada S, Aharinejad S. Lingual Papillae of the Growing Rat as a model of vasculogenesis. Anat Rec 1997; 247:253-60.
9. Makiyama MC, Watanabe IS, Mizusaki CI, König Júnior B. Three-dimensional angioarchitecture of tongue corrosion casts from normal young rats. Anat Anz 1998; 180(4):327-30.
10. Motoyama AA, Watanabe IS. Light and scanning electron microscopic studies of the angioarchitecture of intrinsic muscle fibers of the anterior rat tongue. J Oral Sci 2001; 43(4):269-75.
11. Ojima K. Functional role and angioarchitectural arrangement of the filiform and fungiform papillae on the medial-dorsal surface of the beagle dog tongue. Ann Anat 2001; 183:325-9.
12. Iwasaki S. Evolution of the structure and function of the vertebrate tongue. J Anat 2002; 201:1-13.
13. Sims PA, Albrecht RM. Improved Tissue Corrosion of Vascular Casts: A Quantitative Filtration Method Used to Compare Tissue Corrosion in Various Concentrations of Sodium and Potassium Hydroxide. Scand Microsc 1993; 7(2):637-43.
14. Hodde KC, Steeber DA, Albrecht RM. Advances in Corrosion Casting Methods. Scand Microsc 1990; 4(3):693-704.

Endereço para correspondência

Leo Kraether Neto
Av. do Imigrante, 517- apto 404
CEP: 96820-030 - Santa Cruz do Sul - RS
Fone: (51) 3715-3884
E-mail: leonet@unisc.br