



Utilização de brocas trefina para a confecção de *tissue microarray*

Use of trephine drills for the production of tissue microarray

Tatiana Maria Folador Mattioli^[a], Lúcia de Noronha^[b], Antônio Adilson Soares de Lima^[c],
Ana Maria Trindade Grégio^[d], Maria Ângela Naval Machado^[e], Marina Luise Viola de Azevedo^[f],
Ana Paula Camargo Martins^[g], Luciana Reis Azevedo-Alanis^[h]

^[a] Doutora em Estomatologia pela Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), cirurgiã-dentista, Curitiba, PR - Brasil.

^[b] Doutora em Patologia, médica patologista, professora do curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), Curitiba, PR - Brasil.

^[c] Doutor em Estomatologia pela Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), cirurgião-dentista, professor adjunto (Estomatologia) da Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, PR - Brasil.

^[d] Doutora em Farmácia Bioquímica pela Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), farmacêutica, professora titular (Farmacologia) da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), Curitiba, PR - Brasil.

^[e] Doutora em Clínica Odontológica pela Unicamp, cirurgiã-dentista, professora adjunta (Estomatologia) da Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, PR - Brasil.

^[f] Bióloga pela Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), Curitiba, PR - Brasil.

^[g] Mestre em Ciências da Saúde pela Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), Bióloga, Curitiba, PR - Brasil.

^[h] Doutora em Estomatologia pela Faculdade de Odontologia de Bauru/ Universidade de São Paulo (FOB-USP), cirurgiã-dentista, professora titular da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), Curitiba, PR - Brasil, e-mail: l.azevedo@pucpr.br

Resumo

Objetivos: Descrever e validar uma técnica alternativa econômica e eficiente para a confecção de amostras teciduais com arranjo matricial (*tissue microarrays*, TMA). **Materiais e métodos:** Utilizou-se um motor, um micromotor, um contra-ângulo redutor 16:1 e brocas trefina de aço inoxidável para osso. Análise histomorfométrica do volume das células acinares de glândulas parótidas foi realizada. Para testar marcadores imunoistoquímicos para células mioepiteliais, acinares e ductais das parótidas foram utilizados calponina e PCNA. **Resultados:** Na análise macroscópica e microscópica das lâminas, não foi encontrada perda total do *tissue* e nem mesmo deslocamento (parcial e/ou total) deste, sendo as perdas teciduais observadas apenas parciais. Das 90 lâminas analisadas, 59 (65%) obtiveram de 50% a 100% do *tissue* com ausência de artefato,

deslocamento ou perda de tecido. **Conclusão:** O equipamento proposto pelos autores para a confecção de amostras teciduais com arranjo matricial representa uma alternativa econômica e eficiente.

Palavras-chave: Amostra de tecido. Glândulas salivares. Imunoistoquímica.

Abstract

Objectives: To describe and validate an inexpensive and efficient alternative for the production of tissue microarrays (TMA). **Materials and methods:** An electric-motor, a hand-piece, a reducing contra-angle hand-piece 16:1 and trephine stainless steel drills for bones were used in this study. A histomorphometric assessment of the volume of the acinar cells of parotid glands was performed. Calponin and PCNA were used to test the immunohistochemical markers for myoepithelial, acinar and ductal cells of parotid glands. **Results:** During the macroscopic and microscopic analysis, total loss of sections was not observed in any slide as well as artifactual ungluing (total and/or partial) of the sections. The loss of sections was partial. Fifty nine (65%) out of 90 slides showed 50%-100% of the tissue without technical artifact, artifactual ungluing or loss of the section. **Conclusion:** The equipment proposed by the authors for the production of arrays represents an inexpensive and efficient alternative.

Keywords: Tissue microarray. Salivary glands. Immunohistochemistry.

Introdução

O arranjo em matriz de amostras teciduais, ou *tissue microarray* (TMA), é uma técnica que foi descrita em 1998 por Kononen et al. (1), com ampla aceitação pela literatura mundial.

O uso do TMA apresenta vantagens como: a economia de reagentes e tempo para realização das reações; uniformização das reações e facilidade na interpretação comparativa dos casos; possibilidade de repetição das reações em múltiplos níveis do bloco; e, ainda, a simplificação do trabalho das linhas de pesquisa pela utilização do bloco em mais de um projeto (2, 3).

O método original do TMA é realizado por um equipamento que retira cilindros de tecido (0,6 a 2,0 mm) dos blocos doadores e os introduz no bloco receptor, já previamente perfurado e posteriormente aquecido para permitir a fusão entre as duas parafinas (4). Como esse equipamento possui um custo alto de aquisição e de manutenção, surgiu a necessidade da elaboração de meios alternativos para a realização do método sem o uso do equipamento, visando ao barateamento dos custos (5).

Uma técnica alternativa sugeriu a adaptação de agulhas hipodérmicas convencionais com uma microrretífica: a ponta ativa em bisel da agulha hipodérmica foi removida, uma janela lateral foi esculpida e nova ponta ativa circular cortante foi

criada. As agulhas hipodérmicas foram acopladas a uma máquina de ilhós para perfurar o bloco doador e remover cilindros de tecido parafinado. Os cilindros de tecido puncionados foram aderidos ordenadamente, com uma fita adesiva de dupla face, em um mapa gerado em computador, e foram instalados no molde histológico e preenchidos por parafina líquida (6).

A utilização do *punch* (bisturi circular) foi feita para remoção do cilindro de parafina para a confecção manual de TMA artesanal. O bisturi circular foi aquecido para facilitar a penetração no bloco doador, em seguida, o *punch* quente foi introduzido com força de pressão e torção na área demarcada do bloco-doador para remover um cilindro de tecido (7, 8). Algumas desvantagens da técnica manual para a confecção artesanal do TMA com o *punch* foram citadas, tais como: dificuldade de remoção do cilindro de tecido parafinado e maceração do bloco doador (9).

Esses métodos descritos são o marco de uma fase de confecção de TMA artesanal, principalmente quanto à acessibilidade dos laboratórios a confecção dos blocos multiamostrais. Algumas limitações técnicas foram observadas, como a dificuldade de remover o cilindro de dentro da agulha, a inviabilidade de confecção de *tissue* de diâmetro maior que 5 mm, dificuldade de corte em tecido muscular e vesícula seminal (9).

Assim, o objetivo deste trabalho foi descrever e validar uma técnica alternativa de baixo custo para a confecção de TMA.

Materiais e métodos

Para a construção do TMA artesanal, foi empregada uma metodologia idealizada pelos autores que consistiu na utilização de um motor elétrico (modelo Smart – VK Driller Equipamentos Elétricos Ltda®, São Paulo, Brasil), um micromotor (VK Driller Equipamentos Elétricos Ltda®, São Paulo, SP, Brasil), um contra-ângulo redutor 16:1 (Kavo do Brasil Ind. Com. Ltda®, Joinville, SC, Brasil) e broca trefina para osso de aço inoxidável de 3.0 mm de diâmetro (Neodent®, Curitiba, PR, Brasil) (Figuras 1 e 2).

A broca trefina, originalmente utilizada em Odontologia para perfuração de osso mandibular ou maxilar, apresenta um corpo cilíndrico com fendas (Figura 2). A ponta ativa (Figura 3) é uma serra circular delicada com extremidade pontiaguda, formando um ângulo de ataque, que facilita a penetração, evitando as vibrações no início da perfuração e maceração do tecido. A serra circular da broca trefina apresenta uma lapidação que permite um corte liso com precisão e segurança. Linhas horizontais gravadas na broca servem para controle da profundidade de perfuração.

O contra-ângulo é um dispositivo de uso manual acoplável ao micromotor no qual o torque e a rotação são transmitidos à broca por meio de um conjunto de eixos e engrenagens com rotação de transmissão do redutor 16:1. A função do redutor é reduzir a rotação do motor e aumentar o torque disponível no eixo de saída.

A construção do TMA teve início com a orientação dos cilindros no bloco receptor. Primeiramente, um mapa para orientar os locais em que os cilindros foram fixados foi elaborado. O mapa de apoio foi composto por colunas identificadas com letras e linhas identificadas com números à semelhança de um plano cartesiano. Cada fragmento retirado do bloco-doador foi colocado no bloco-receptor conforme o mapa. A amostra recebeu a identificação de uma letra e um número, conforme a sua localização no bloco-receptor. Esse procedimento facilitou a leitura das lâminas histopatológicas que foram posteriormente confeccionadas a partir dos blocos de micro dissecação (blocos-receptores) para os ensaios laboratoriais.



Figura 1 - Motor, micromotor, contra-ângulo redutor 16:1 e broca trefina para osso de aço inoxidável de 3.0 mm de diâmetro utilizados para construção do *tissue microarray* artesanal

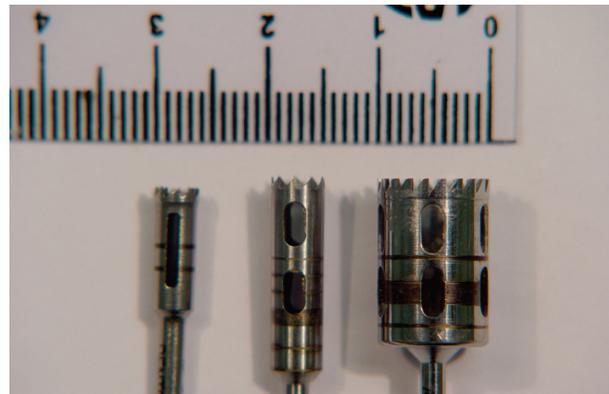


Figura 2 - Brocas trefinas de diferentes diâmetros

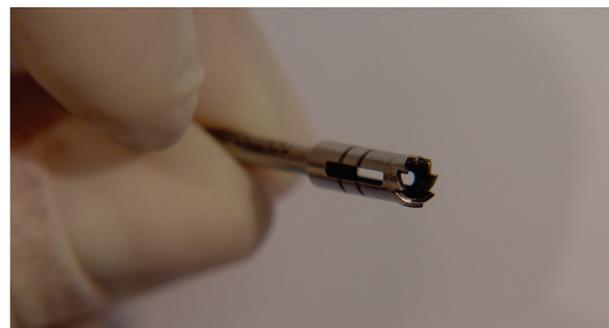


Figura 3 - Ponta ativa da broca trefina

Para a remoção dos *arrays* cilíndricos, o motor foi acionado (por meio de um pedal) numa rotação média e constante de 1.800 rpm. A broca instalada no contra-ângulo foi posicionada num ângulo de 90 graus em relação ao bloco (que foi fixado com a mão oposta àquela que segurava o contra-ângulo) e, com movimento de “vai-vem” (sobe e desce) e aprofundamento gradual, feito com o braço (sem movimento de punho), fez-se o corte do espécime.

A profundidade da perfuração foi controlada pela graduação grafada na própria broca trefina e foi mantida constante para todos os cilindros (Figura 2).

Após o corte do *array*, com uma sonda exploradora, o tecido foi empurrado para baixo pela canaleta da broca trefina. O cilindro de parafina foi, então, removido (Figura 4) e armazenado em recipiente com divisões e marcações para melhor organização do material. Em seguida, o banho de parafina foi feito e os blocos receptores foram montados.

As Figuras 5 e 6 ilustram a uniformidade das margens do *tissue* e a integridade do bloco doador após a remoção do *tissue* com utilização de broca trefina de diâmetro 10.0 mm. Após a confecção dos blocos de TMA, foram confeccionadas lâminas com 4 µm de espessura coradas com HE para demonstração da qualidade do corte (10, 11).

As lâminas para as montagens dos TMAs foram submetidas à técnica de silanização tradicional. Na análise das lâminas pelo microscópio Olympus® BX50 (Olympus Corporation, Ishikawa, Japão), as margens da lesão mostraram-se íntegras, lisas e uniformes.

Avaliação macroscópica das perdas teciduais

Uma desvantagem da utilização de TMA é a perda total ou parcial das amostras de TMA ou ainda o deslocamento delas, comprometendo o resultado final (12). Para analisar o percentual de perda de amostras, foi utilizado o protocolo modificado de análise proposto por Almeida et al. (12) descrito como (A) “sem perda” (acima de 74% da área do cilindro presente na lâmina); (B) “perda parcial” (entre 50% e 74% do cilindro presente na lâmina); (C) “perda quase total” (entre 25% e 49% do cilindro presente na lâmina); (D) “perda total” (entre 1% e 24% do cilindro presente na lâmina). Por meio da avaliação macroscópica, foram analisadas, a olho



Figura 4 - Remoção do cilindro de parafina da broca trefina com auxílio de sonda exploradora

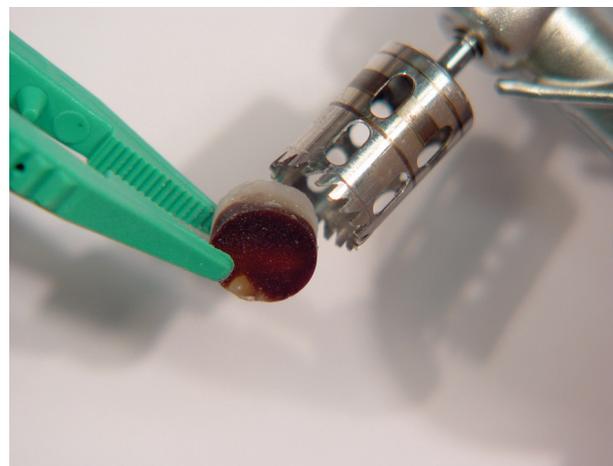


Figura 5 - Uniformidade das margens após a remoção do *tissue* com utilização de broca trefina de diâmetro 10.0 mm

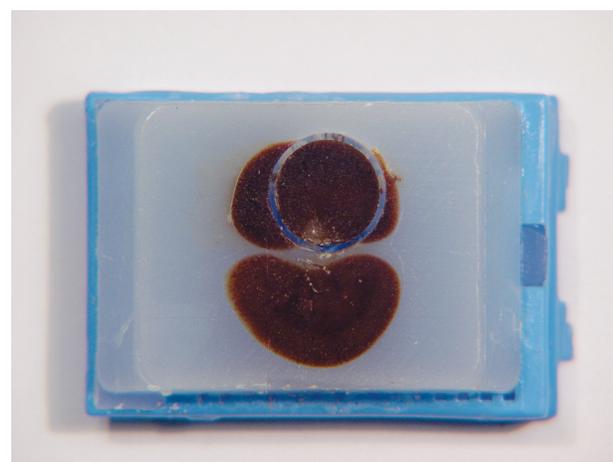


Figura 6 - Integridade do bloco doador após a remoção do *tissue* com utilização de broca trefina de diâmetro 10.0 mm

nu, as lâminas coradas pelo HE, e imunomarcadas pela calponina (Cma) e pelo PCNA (Pma).

Avaliação microscópica das perdas teciduais

Para complementar a avaliação macroscópica, os autores acrescentaram uma avaliação microscópica do número de campos histológicos possíveis de serem avaliados, analisando cada *tissue* no microscópio Olympus® BX50 (Olympus Corporation, Ishikawa, Japão) num aumento de 400 X, após as imunorreações com a calponina e com o PCNA. Considerou-se que em um *tissue* de 3.0 mm de diâmetro, 100% de campos possíveis de serem avaliados (sem perda ou deslocamento tecidual e sem artefato técnico) correspondiam a 24 campos histológicos.

Na padronização da avaliação microscópica, foi estabelecido que: (A) "sem perda", o número de campos avaliáveis (Ca) era ≥ 18 campos, equivalente a 75%-100% da área total; (B) "perda parcial", o número de Ca era entre 12 e 17 campos, correspondente a 50-74% da área total; (C) "perda quase total", o número de Ca era entre 6 e 11 campos, correspondente a 25-49% da área total; (D) "perda total", o número de Ca era entre 0 e 5 campos, correspondente a 1-24% da área total. Para a avaliação microscópica, foram analisadas as lâminas marcadas pela calponina (Cmi) e pelo PCNA (Pmi).

Análise imunoistoquímica

Para testar a efetividade do TMA, foi realizada análise imunoistoquímica de lâminas de espécimes de glândulas salivares. As lâminas foram examinadas em microscópio Olympus BX50 (Olympus Corporation, Ishikawa, Japão), utilizando objetivas de 40X e 100X (com óleo de imersão).

Na técnica imunoistoquímica, utilizou-se o método do Envision Dual Link. As imunorreações com a calponina utilizaram diluição do anticorpo em 1:800 e para o PCNA diluição 1:400.

A expressão imunoistoquímica da calponina nas células mioepiteliais e a do PCNA nas células acinares e ductais foram analisadas verificando-se imagens de todas as áreas possíveis de serem avaliadas (foi levada em consideração a integridade e a qualidade do tecido e a presença de artefato de técnica),

segundo o padrão do número de campos avaliados anteriormente descrito.

Testes estatísticos foram realizados (SPSS versão 15.0 para Windows) a fim de testar a normalidade das variáveis (Kolmogorov-Smirnov) e a homogeneidade das variâncias entre os grupos (Levene). Para avaliação da perda tecidual macroscópica e microscópica, foi utilizado o Teste de Correlação de Spearman. Todos os testes foram realizados com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Resultados

Resultados macroscópicos e microscópicos

Na análise das lâminas, observou-se um resultado satisfatório quanto às perdas de tecido dos TMA das lâminas silanizadas. Em nenhuma amostra houve perda total do *tissue* e nem mesmo deslocamento (parcial e/ou total) do *tissue* foi observado. As perdas observadas tanto na macroscopia quanto na microscopia foram parciais. Em todos os *tissues* de todas as lâminas, restaram 50% ou mais de tecido.

Na avaliação macroscópica, apenas 5% das lâminas marcadas com calponina (Cma) e apenas 6% das lâminas coradas com HE e PCNA (Pma) apresentaram perda parcial de tecido.

Na avaliação microscópica, das 90 lâminas analisadas, 59 (65%) lâminas marcadas com calponina (Cmi) e 51 (56%) lâminas marcadas com PCNA (Pmi) obtiveram de 50 a 100% do *tissue* com ausência de artefato, deslocamento ou perda de tecido.

Houve correlação estatística significativa entre Cmi x Cma ($p = 0,000$; $r = 0,45$); Cma x HE ($p = 0,000$; $r = 0,69$); Pmi x Pma ($p = 0,000$; $r = 0,57$); Pma x HE ($p = 0,000$; $r = 0,71$); Cmi x Pmi ($p = 0,000$; $r = 0,38$); Cma x Pma ($p = 0,000$; $r = 0,74$).

Resultados imunoistoquímicos

Todos os espécimes estudados exibiram positividade para o anticorpo calponina, sendo considerada positiva a célula que exibiu qualquer expressão para a calponina no epitélio glandular, representada por cor acastanhada, independentemente da intensidade da coloração, ou seja, o suficiente para diferenciação entre as células positivas e negativas.

Para o imunorreagente PCNA, as lâminas submetidas à imunorreação foram avaliadas para identificar a presença ou ausência de marcação contra o antígeno para o anticorpo PCNA. Considerou-se positiva a célula que exibiu qualquer expressão para o PCNA no epitélio glandular, representada por cor acastanhada, independentemente da intensidade da coloração. Todos os espécimes estudados exibiram positividade para o anticorpo PCNA.

Discussão

TMA artesanal

A literatura revela um crescente número de publicações propondo técnicas alternativas para a construção do TMA artesanal decorrente do alto custo dos equipamentos manuais e automáticos disponíveis comercialmente (11 e 24 mil dólares) (2, 4, 5, 7, 8). No presente estudo, os autores propõem uma técnica alternativa para a remoção do cilindro de tecido do bloco doador, de baixo custo e fácil execução, a fim de complementar as técnicas de TMA artesanal já descritas.

Com a técnica proposta no presente estudo, uma broca trefina foi utilizada por apresentar excelente poder de corte. Originalmente, essa broca é utilizada para cortar osso. A ponta ativa da trefina, uma serra circular delicada com extremidade pontiaguda (Figura 3), possibilitou fazer cortes com precisão e segurança. Em trabalho anterior (9), o *punch* foi utilizado para remover o cilindro de tecido do bloco doador. No entanto, foi observado que a vesícula seminal não se apresentou com qualidade quando preparada no método do TMA, por se tornar extremamente rígida após a fixação e impedir a penetração da pinça de *punch*. Foi observado que o corte com o *punch* alterava as características morfológicas do espécime. O tecido muscular também sofreu inúmeros artefatos depois de utilizada a técnica do *punch*. Por ser constituído de fibras musculares, houve maior dificuldade no corte da amostra pelo bisturi circular e, ao sofrer o procedimento histológico, o tecido abriu, alterando suas características morfológicas. Todos os outros tecidos apresentaram resultados satisfatórios quando submetidos à técnica do *punch* (9). Com a utilização da broca trefina, não existiriam as limitações de corte da vesícula seminal e do tecido muscular.

No presente estudo, as análises macroscópicas e microscópicas das lâminas coradas com HE, calponina e PCNA mostraram resultados satisfatórios para as perdas parciais de tecido. Na análise macroscópica, menos de 10% das lâminas marcadas com calponina e PCNA tiveram perdas parciais de tecido. Na análise microscópica, menos de 45% das lâminas apresentaram perdas parciais de tecido. Para a imunorreação com calponina e PCNA, houve correlação significativa entre as análises macroscópica e microscópica ($r = 0,45$, $r = 0,57$, respectivamente), mostrando a relação entre perdas parciais macroscópicas e número de campos avaliáveis microscopicamente. Quando foi testada a correlação entre as análises macroscópicas das lâminas marcadas com HE, e com PCNA e calponina, foram observadas correlações altas entre HE e PCNA ($r = 0,71$), e HE e calponina ($r = 0,69$), reforçando a concordância entre perdas parciais macroscópicas em diferentes colorações/imunorreações.

Na técnica do *punch*, é necessário pré-aquecimento da pinça e ainda aplicação de força de pressão e torção para a penetração do *punch* no bloco e corte do fragmento. No presente estudo, com o equipamento proposto, observa-se que não é necessário aquecimento, nem mesmo aplicação de forças de pressão e torção, pois o equipamento, quando acionado, gera força de pressão e torção ou torque uniformes e constantes. As forças são geradas por um aparelho especializado (motor de uso odontológico) em não gerar estresse e necrose em tecido ósseo vivo (excesso de calor); assim sendo, não gera maceramento do tecido embocado (margens picotadas e destroçadas) (7, 8).

A ação de corte gerada pelo equipamento proposto é muito rápida, leva segundos, diferentemente da técnica do *punch*, que pode durar minutos. Adicionalmente, as fendas no corpo cilíndrico da broca permitem remover com facilidade o tecido cortado (Figuras 2 e 4). A broca gera fragmentos uniformes para pesquisa e é disponível comercialmente em vários diâmetros (Figura 2). Há empresas especializadas que fabricam estas brocas sob medida.

Schuler et al. (9) constataram que pinças do tipo *punch* de 5 mm de diâmetro eram grandes demais para perfurar o bloco doador e que, quanto maior o diâmetro da pinça, mais cônico era seu formato, o que resultava na rachadura dos blocos doadores e a consequente perda do restante da amostra dos mesmos. Com a broca trefina, isso não é observado,

pois, graças às propriedades de corte e formato uniforme, não existe destruição, fratura, nem mesmo rachaduras do bloco doador. Até mesmo brocas com diâmetro de 10 mm (a maior encontrada comercialmente, Neodent®, Curitiba, PR, Brasil) mantiveram a integridade do bloco doador (Figura 6).

Nos cortes histológicos do *array*, foi observada preservação morfológica aceitável e suficiente para a confirmação diagnóstica, sendo as margens do corte íntegras e lisas. Com essa metodologia, há facilidade de montagem para os painéis imunoistoquímicos. É uma alternativa econômica e rápida em relação aos equipamentos comerciais – o custo do equipamento é viável e variável (a partir de R\$ 500,00 ou US\$ 250).

Conclusão

A obtenção de TMA com a utilização de brocas trefina mostrou-se segura e representa uma alternativa viável e acessível para novos estudos.

Referências

- Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Bärnlund M, Schraml P, Leighton S, et al. Tissue microarrays for high throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med*. 1998;4(7):844-7.
- Andrade VP, Cunha IW, Silva EM, Ayala F, Sato Y, Ferreira SS, et al. Tissue microarrays: high throughput and low cost available for pathologists. *J Bras Patol Med Lab*. 2007;43(1):55-9.
- Rocha RM, Andrade VP, Nunes CB, Rocha GFS, Sanches FSF, Oliveira FN, et al. Construção de arrays de tecido com equipamento alternativo e de baixo custo para estudo imuno-histoquímico de tumores mamários. *J Bras Patol Med Lab*. 2006;42(6):477-82.
- Gulmann C, Butler D, Kay E, Grace A, Leader M. Biopsy of a biopsy: validation of immunoprofiling in gastric cancer biopsy tissue microarrays. *Histopathology*. 2003;42(1):70-6.
- Gurmini J, Cecílio WAC, Schuler SL, Olandoski M, Noronha L. Desnutrição intra-uterina e suas alterações no intestino delgado de ratos Wistar ao nascimento e após a lactação. *J Bras Patol Med Lab*. 2005;41(4):271-8.
- Pires ARC, Andreiuolo FM, Souza SR. TMA for all: a new method for the construction of tissue microarrays without recipient paraffin block using custom-built needles. *Diagn Pathol*. 2006;1:14.
- Jensen TA. The tissue microarray: a technical guide for histologists. *J Histotechnol*. 2001;24(4):283.
- Jensen TA. Tissue microarray: advanced techniques. *J Histotechnol*. 2003;26(2):101.
- Schuler SL, Gurmini J, Cecílio WA, Viola de Azevedo ML, Olandoski M, de Noronha L. Hepatic and thymic alterations in newborn offspring of malnourished rat dams. *J Parenter Enteral Nutr*. 2008;32(2):184-9.
- Onofre MA, de Souza LB, Campos A Jr, Taga R. Stereological study of acinar growth in the rat parotid gland induced by isoproterenol. *Arch Oral Biol*. 1997;42(5):333-8.
- Silva S. Efeitos de antidepressivos (fluoxetina e venlafaxina) e da pilocarpina sobre as glândulas parótidas de ratos. Análises histomorfométrica e sialométrica. [dissertação]. Curitiba: Pontifícia Universidade Católica do Paraná; 2007.
- Almeida JS, Costa HO, Lima FO, Pinheiro N Jr, Oshima CTF, Gomes TS, et al. Perda de amostras em tissue microarray: comparação entre técnicas com uso de fita adesiva comercial, lâminas silanizadas pelo método tradicional ou por método modificado. *J Bras Patol Med Lab*. 2008;44(5):359-65.

Recebido: 22/07/2011

Received: 07/22/2011

Aprovado: 27/08/2011

Approved: 08/27/2011