

Avaliação Quantitativa de Núcleo/Citoplasma e AgNORs em Células da Mucosa Bucal de Fumantes e Não-Fumantes*

*Quantitative analysis of nucleus-to-cytoplasm ratio and number of AgNORs in oral mucosa cells of smokers and non-smokers**

Tatiana Andrea Soares Pinto**

Pantelis Varvaki Rados***

Manoel Sant'Ana Filho***

João Jorge Diniz Barbachan***

RESUMO

A citopatologia bucal é um método de diagnóstico baseado em células obtidas por raspagem. Com a finalidade de constatar quantitativamente as alterações celulares ocasionadas pelo fumo em mucosa bucal normal, durante a Campanha de Combate ao Câncer de Novo Hamburgo/RS de 2000, foram selecionados todos os indivíduos homens, fumantes e não-fumantes, acima de 40 anos e sem lesão bucal aparente. O processo de seleção resultou em um total de 13 fumantes e 9 não-fumantes. Os sítios bucais estudados foram: lábio, soalho bucal e língua. De cada sítio estudado foram obtidos dois esfregaços, sendo o primeiro submetido à técnica de impregnação pela prata (AgNORs) para avaliação quantitativa via IMAGELAB e o segundo ao método de Papanicolaou Modificado para confirmação de normalidade. Através do teste estatístico Mann-Whitney ($p=0,05$) foram obtidos os seguintes resultados: (1) em soalho, o número de AgNORs por núcleo foi superior em fumantes comparado ao grupo não-fumantes; (2) em língua, a relação núcleo/citoplasma em fumantes é maior em comparação aos não-fumantes; (3) em lábio, o grupo com média acima de 3 AgNORs/núcleo apresentou área nuclear maior. Considerando que cada sítio possui comportamento específico frente às injúrias ocasionadas pelo fumo, concluímos que as referências quantitativas de relação núcleo/citoplasma e número de AgNORs/núcleo são eficazes para o controle de alterações celulares prévias à lesão bucal visível.

PALAVRAS-CHAVE

Citopatologia; Fumo; Mucosa Bucal; AgNORs; Relação Núcleo/Citoplasma

INTRODUÇÃO

O Ministério da Saúde estima que, para 2003, em todo o Brasil, ocorrerão 402.190 casos novos e 126.960 óbitos por câncer. Para o sexo masculino, são esperados 186.155 casos novos e 68.350 óbitos, enquanto que, para o sexo feminino, são estimados 216.035 casos novos e 58.610 óbitos. Em relação ao câncer de boca, o Rio Grande do Sul tem uma taxa estimada para 2003 de 11,12 casos para cada 100.000 homens e de 1,87 casos para cada 100.000 mulheres. Sendo os sítios de maior prevalência na cavidade bucal: o vermelhão do lábio inferior, o soalho bucal e a borda da língua (JORDAN e DALEY, 1997). Estudos epidemiológicos apontam que a ocorrência do carcinoma espinocelular é mais freqüente em indivíduos fumantes acima de 40 anos de idade (Boyle et al, 1990; SILVERMAN, 1990; SÁWYER, 1992; PINHOLT, RINDUM, PINDBORG, 1997).

O aumento da atividade proliferativa e da relação núcleo/citoplasma são alguns dos critérios estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde para a determinação de alterações celulares compatíveis com a ocorrência de alterações Malignas (PINDBORG, 1997).

A técnica que utiliza a impregnação pela

prata é específica para a detecção das regiões organizadoras nucleolares (NORs) ativas, as quais são possíveis de serem identificadas pela ligação da prata às proteínas não-histônicas associadas estritamente a essas regiões. Cada NOR representa uma unidade de transcrição ribossomal componente do nucléolo, sendo as NORs ativas aquelas onde o DNAr potencialmente ativo é localizado. As NORs após impregnação pela prata são denominadas AgNORs e através da microscopia de luz podem ser identificadas como pontos pretos dentro de núcleos de contorno bem definido (OLIVEIRA, LAUXEN, SANT'ANA FILHO, 1999). A quantificação das regiões organizadoras nucleolares impregnadas pela prata (AgNORs) representa um recurso para a avaliação da atividade proliferativa de neoplasias (WHITAKER et al, 1993, COSTA et al, 1999; DERENZINI, 2000). A utilização da técnica de AgNOR em citopatologia viabiliza a constatação de alterações relativas à atividade proliferativa celular em mucosa bucal clinicamente normal (SAMPAIO, et al, 1999; CANÇADO, YURGEL, SANT'ANA FILHO, 2001). Considerando a importância do diagnóstico de alterações celulares prévias à ocorrência de lesão bucal visível, o presente estudo tem por objetivo quantificar o número de AgNORs por núcleo e mensurar as áreas nuclear e citoplasmática de esfregaços de mucosa bucal do lábio, so-

alho e língua de pacientes fumantes e não-fumantes. A comparação entre os resultados obtidos nos diferentes grupos visa constatar quantitativamente as alterações celulares prévias à presença de lesão bucal aparente resultantes dos efeitos do fumo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Durante a Campanha de Combate ao Câncer Bucal de Novo Hamburgo realizada em setembro de 2000, foram selecionados todos os indivíduos do gênero masculino acima de 40 anos e com ausência de lesão bucal clinicamente visível que durante a anamnese informaram apresentar as seguintes características: (1) hábito de fumar acima de 20 cigarros/dia ou nunca ter fumado; (2) ausência de doenças sistêmicas; (3) sem história pregressa ou atual de neoplasias benignas ou malignas. O processo de seleção resultou em um total de 22 pacientes que foram divididos em dois grupos: fumantes e não-fumantes. Os grupos formados constituíram-se respectivamente por 13 fumantes e 9 não-fumantes. Foram considerados fumantes aqueles que fumavam mais de 20 cigarros/dia (OGDEN, COWPE, GREEN, 1990). Sendo considerados não-fumantes os indivíduos que nunca fumaram. Portanto, não foram incluídos neste estudo ex-fumantes.

A obtenção do material para estudo foi realizada através da citopatologia. Com

*Dissertação de Mestrado em Patologia Bucal FO-UFRGS

**Pós-Graduada Nível Mestrado

***Professor Doutor / Curso de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da UFRGS

o auxílio de uma espátula de madeira foram obtidos esfregaços dos seguintes sítios bucais: vermelhão do lábio inferior, terço médio da borda da língua do lado esquerdo e porção anterior do assoalho bucal. O material coletado foi distendido sobre uma lâmina de vidro para microscopia previamente identificada e acondicionado em frasco tipo Borel contendo etanol a 95% como fixador. Foram realizados dois esfregaços em cada sítio, referente a cada paciente. Tal metodologia resultou na obtenção de 66 esfregaços, sendo 39 de fumantes e 27 de não-fumantes que foram submetidos à técnica de impregnação pela prata adaptada por PLOTON et al (1986) e de 66 esfregaços, sendo 39 de fumantes e 27 de não-fumantes que foram corados pelo Método de Papanicolaou modificado.

A análise morfológica das células presentes nos esfregaços corados pelo método de Papanicolaou modificado foi realizada em um microscópio de luz marca Zeiss modelo Standart 20, com aumento inicial de 100x, por um observador previamente calibrado. Nos casos em que houve a necessidade de distinção entre uma possível alteração celular e a presença de defeitos em relação à sobreposição dos constituintes celulares, procedeu-se à observação microscópica em aumento de 400x.

A lâmina foi avaliada em toda a sua extensão, no sentido horizontal, da esquerda para a direita, sendo observadas no mínimo 100 células por esfregaço. Tais esfregaços foram classificados segundo os critérios estabelecidos por PAPANICOLAOU e TRAUT (1943). A técnica de Papanicolaou foi adotada neste estudo com a finalidade de confirmar o caráter de normalidade dos esfregaços obtidos da mucosa bucal com ausência de lesão clinicamente visível (Figuras 1 e 2).

A observação das células presentes nos esfregaços submetidos à impregnação pela prata foi realizada em um microscópio de luz marca Zeiss modelo Standart 20 em aumento aproximado de 400x, por um observador previamente calibrado. Os esfregaços foram avaliados em toda a sua extensão, no sentido horizontal, da esquerda para a direita. As avaliações quantitativas foram realizadas nas primeiras 100 células nucleadas distendidas e não sobrepostas presentes em cada esfregaço. Células anucleadas não foram incluídas neste estudo.

A metodologia de captura das imagens para avaliação quantitativa consistiu na identificação microscópica inicial em aumento aproximado de 400x de uma célula nucleada distendida e não-sobreposta e transmissão desta imagem via

vídeo-câmera colorida marca JVC modelo TK C-620 para um monitor de vídeo TCE 17". As especificações refe-

rentes a imagem digitalizada obtida constituem: alta qualidade de vídeo, padrão RGB (16,7 milhões de cores), tamanho 160x120 pixels, formato BMP. A partir desta imagem digitalizada, procedeu-se à contagem do número de AgNORs e mensuração das áreas total e nuclear através da utilização do sistema de processamento e análise de imagem IMAGELAB® Versão 2.3. Obteve-se o valor correspondente à área citoplasmática, a partir da subtração de valores entre as áreas total e nuclear. Os critérios utilizados para a contagem das AgNORs foram os estabelecidos por Crocker et al (1989). Sendo estes, a contagem de todas as estruturas esféricas impregnadas pela prata presentes dentro de núcleos de contorno bem definido. E, no caso da existência de agregados (pontos pretos unidos ou sobrepostos), estes devem ser contados como apenas uma estrutura (Figura 3).

A tabulação dos dados foi realizada considerando o número de AgNORs e o valor de área nuclear e citoplasmática de cada célula nucleada distendida e não sobreposta observada

na lâmina. A relação núcleo/citoplasma (N/C) correspondeu à razão entre os valores da área nuclear e citoplasmática. Os valores submetidos ao teste estatístico de Mann-Whitney ($p=0,05$) foram as médias por lâmina de cada uma das variáveis consideradas neste estudo. Os resultados referentes à comparação dos valores relativos a contagem do número de AgNORs/núcleo e a mensuração das áreas nuclear e citoplasmática das células observadas em esfregaços de pacientes fumantes e não-fumantes serão apresentados a seguir sob a forma de gráficos e tabelas.

RESULTADOS

Mediante a análise qualitativa das lâminas coradas pelo método de Papanicolaou Modificado foi observado, em fumantes e não-fumantes, predomínio de esfregaços classe II nos três sítios estudados. O único esfregaço classe III (Figura 3) observado na totalidade da amostra foi obtido do soalho bucal de paciente fumante (Tabela 1).

Tabela 1. Distribuição e freqüência dos esfregaços classificados e corados pelo Método de Papanicolaou Modificado nos grupos de fumantes e não-fumantes de acordo com o sítio anatômico. Porto Alegre. 2001.

	Fumantes						Não-Fumantes					
	Lábio		Soalho		Língua		Lábio		Soalho		Língua	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Classe I	6		46,15		1		7,69		2		15,38	
	2		22,22		0		0		0		0	
Classe II	7		53,85		11		84,62		11		84,62	
	7		77,78		9		100		9		100	
Classe III	0		0		1		7,69		0		0	
	0		0		0		0		0		0	

Fonte: Pacientes atendidos durante a Campanha de Combate ao Câncer de Novo Hamburgo/RS. 2000.

Em relação à média do número de AgNORs por núcleo obtida em esfregaços de mucosa bucal normal de pacientes fumantes e não-fumantes, foram verificadas diferenças significativas ($p=0,05$) entre esses grupos no sítio soalho de boca. O grupo fumante possui quantidade superior de AgNORs por núcleo em comparação ao não-fumante. Nos demais sítios bucais estudados, não foram observadas diferenças significativas relativas a esta variável nos diferentes grupos (Gráfico 1).

Em língua, foi verificada variação significativa ($p=0,05$) da relação núcleo/citoplasma (N/C) entre fumantes e não-fumantes. O grupo fumante apresenta maior valor correspondente à N/C em comparação ao grupo não-fumante. Em lábio e soalho bucal, não foram verificadas diferenças significativas em relação a esta variável entre os diferentes grupos estudados (Gráfico 2).

Mediante a comparação do tamanho da área de núcleos com mais de 3AgNORs e núcleos com 3 ou menos AgNORs, foi constatada diferença significativa ($p=0,033$) no

lábio. O grupo com mais de 3 AgNORs/núcleo apresentou maior área nuclear. Nos demais sítios bucais, tal constatação não foi estatisticamente significativa (Gráfico 3).

DISCUSSÃO

A amostra selecionada neste estudo constituída por homens acima de 40 anos, teve por finalidade representar o grupo de maior prevalência em relação ao câncer bucal, considerando os dados epidemiológicos citados na literatura (PLOTON et al, 1990; JORDAN e DALEY, 1997; INCA, 2001). A busca de alterações quantitativas prévias à lesão bucal aparente em esfregaços de pacientes fumantes é justificada pela ação carcinogênica e genotóxica do tabaco (INCZE et al, 1982; HOFFMANN e WYNTER, 1986; LÖFROTH, 1989). A constatação de SPEIGHT e MORGAN (1993), de que diversas etapas relacionadas a alterações de comportamento e morfologia celular antecedem a ocorrência do câncer bucal, justifica a hipótese deste estudo sobre a avaliação da mucosa bucal sem

lesão aparente com a finalidade de surpreender alterações celulares antes da ocorrência de manifestação clínica.

Utilizando o sistema IMAGELAB® para a mensuração nuclear e determinação da relação núcleo/citoplasma (N/C) em células de esfregaços de mucosa bucal normal de fumantes e não-fumantes em lábio, soalho bucal e língua; verificamos aumento significativo ($p=0,016$) da relação N/C nas células de esfregaços de borda de língua de pacientes fumantes. Tal resultado demonstra um comportamento específico da língua frente às injúrias ocasionadas pelo fumo em comparação aos demais sítios bucais.

A avaliação da proliferação celular através da quantificação das regiões organizadoras nucleolares impregnadas pela prata (AgNORs) está sedimentada na literatura (WHITAKER et al, 1993; COSTA et al, 1999; DERENZINI, 2000). Em nosso estudo, foram constatadas alterações relativas ao grau de proliferação celular a partir da quantificação de AgNORs/núcleo. Buscando verificar através do método de impregnação pela prata as diferenças relativas ao grau de proliferação celular presentes em esfregaços de mucosa bucal normal de fumantes e não-fumantes realizados em lábio, soalho bucal e língua, constatamos diferenças significativas ($p=0,045$) em relação à média do número de AgNORs/núcleo entre o grupo fumante e não-fumante nas células epiteliais da mucosa do soalho de boca. Neste sítio, o grupo fumante apresentou quantidade superior de AgNORs por núcleo em comparação ao grupo não-fumante. Tal achado juntamente com a correlação entre o aumento da proliferação celular na mucosa bucal e o hábito de fumar mencionados por Cançado, Yurgel e Sant'Ana Filho (2001), confirmam as afirmações citadas por SAMPAIO et al (1999) sobre a existência de um aumento da atividade proliferativa nas células da mucosa bucal normal de fumantes.

Em esfregaços de lábio constatamos que a área nuclear é significativamente maior ($p=0,033$) em células com mais de 3AgNORs/núcleo em comparação às células com 3 ou menos AgNORs/núcleo, indicando uma correlação positiva entre tamanho nuclear e número de AgNORs/núcleo. Os resultados obtidos em borda de língua e soalho de boca também mostram relação direta entre aumento da área nuclear e do número de AgNORs/núcleo, porém sem comprovação estatística.

O emprego da citopatologia em mucosa bucal sem lesão clinicamente visível realizado neste estudo, reafirma os achados de SOARES PINTO, PHILIPPI e RADOS (2000) como um método auxiliar de diagnóstico eficaz na prevenção do câncer bucal. A sua utilização à semelhança dos exames preventivos de câncer de colo de útero necessita de mais estudos.

A ocorrência de diferenças significativas de relação núcleo/citoplasma em língua e do número de AgNORs por núcleo

em soalho de boca comparando-se fumantes e não-fumantes, confirma a especificidade da resposta celular de cada sítio. Embora as alterações em soalho bucal estejam associadas ao número de AgNORs por núcleo e em língua à relação núcleo/citoplasma, em ambos os casos houve modificação do padrão celular normal devido aos efeitos ocasionados pelo fumo. Em relação à variação positiva entre o aumento do número de AgNORs/núcleo e o aumento da área nuclear verificada em células epiteliais da mucosa do lábio, outros estudos envolvendo um maior amostra devem ser realizados para avaliar este achado considerando especificamente grupo fumante e não-fumante.

CONCLUSÕES

De acordo com a metodologia deste estudo e baseados na análise dos resultados obtidos, é possível sugerir que as referências quantitativas de relação núcleo/citoplasma e número de AgNORs por núcleo são eficazes para o controle citopatológico de alterações celulares prévias à lesão bucal aparente.

ABSTRACT

Cytopathology is a diagnostic method based on cell scrapings. The purpose of this study was to quantify cell changes caused by tobacco consumption. We selected 13 smoking and 9 non-smoking men older than 40 years who participated in the 2000 Campaign Against Cancer in Novo Hamburgo, Brazil. The sites selected for study were lip, tongue and floor of mouth. Two scrapings were collected from each site; one was silver stained (AgNORs) and analyzed quantitatively by the Imagemlab system; the other was stained by the modified Papanicolaou method. The Mann-Whitney statistical analysis ($p=0,05$) showed that: (1) number of AgNORs per nucleus was greater in the floor of mouth of smokers than of non-smokers; (2) nucleus-to-cytoplasm ratio was greater in smokers' than in non-smokers' tongues; (3) nuclear area was larger in lip cells that had 3 or more AgNORs per nucleus. Each site displayed a specific behavior in response to injuries caused by smoking habits. Results suggest that quantitative analysis of nucleus-to-cytoplasm ratio and number of AgNORs per nucleus may be efficient methods of assessing cell changes before an oral lesion is visible.

KEYWORDS

Cytopathology; Smoking; Oral Mucosa; AgNORs; Nucleus-to-Cytoplasm ratio

REFERÊNCIAS

BOYLE, P.; MacFARLANE, G.J.; MAISONNEUVE, P. et al. **Epidemiology of mouth cancer in 1989: a review.** JR Soc Med, London, v. 83, n. 11, p. 724-730, Nov. 1990.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Assistência à Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil em 2003.** [Capturado 2004 Jan. 27] Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativas/2003/>

CANÇADO, R. P.; YURGEL, L. S.; SANT'ANA FILHO, M. **Evaluation of the nucleolar organizer region associated proteins in exfoliative cytology of normal buccal mucosa. Effect of smoking.** Oral Oncol Oxford, v.37, n.5, p.446-454, July 2001.

COSTA, A.L. L.; ARAÚJO, N. S.; PINTO Jr, D. S., et al. **PCNA/AgNOR and Ki-67/AgNOR double staining in oral squamous cell carcinoma.** J Oral Pathol Med Copenhagen, v.28, n.10, p.438-441, Nov. 1999. University Press, 1991. 165-187.

CROCKER, J.; BOLDY, D. A.; EGAN, M. J. **How should we count AgNORs? Proposals for a standardized approach.** J Pathol, London, v.158, n.3, p.185-188, July 1989.

DERENZINI, M. **The AgNORs.** Micron, Oxford, v.31, n.2, p.117-120, Apr. 2000.

HOFFMANN, D.; WYNDER, E. L. **Chemical constituents and bioactivity of tobacco smoke.** IARC Sci Publ, Lyon, n. 74, p.145-165, 1986.

INCZE, J.; et al. **Premalignant changes in normal appearing epithelium in patients with squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract.** Am J Surg, New York, v.144, n.4, p.401-405, Oct. 1982.

JORDAN, R. C. K.; DALEY, T. **Oral squamous cell carcinoma: new insights.** J Can Dent Assoc, Ottawa, v.63, n.7, p.517-525, July/Aug. 1997.

LÖFROTH, G. **Environmental tobacco smoke: overview of chemical composition and genotoxic components.** Mutat Res, Amsterdam, v.222, n.2, p.73-80, Feb. 1989.

OGDEN, G. R.; COWPE, J. G.; GREEN, M. W. **Quantitative exfoliative cytology of normal buccal mucosa: effect of smoking.** J Oral Pathol Med, Copenhagen, v.19, n.2, p.53-55, Feb. 1990.

OLIVEIRA, M. G. de; LAUXEN, I. da S.; SANT'ANA FILHO, M. **O que são Regiões Organizadoras Nucleolares (NORs) e qual a utilidade da técnica de AgNOR.** Rev Odonto Ciência, Porto

Alegre, v.14, n.28, p.129-139, Dez 1999.

PAPANICOLAOU, G. N.; TRAUT, H. F. Diagnosis of uterine cancer by vaginal smear. New York: Commonwealth Fund; 1943. 46 p.

PINDBORG, P. A.; et al. **Histological Typing of Cancer and Precancer of the Oral Mucosa.** World Health Organization. International Histological Classification of Tumours. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 1997.

PINHOLT E M, RINDUM J, PINDBORG J J. **Oral cancer: a retrospective study of 100 Danish cases.** Br J Oral Maxillofac Surg, Edinburg, v.35, n.2, p.77-80, Apr. 1997.

PLOTON, D.; et al. **Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level.** Histochem J, Dordrecht, v.18, n.1, p.5-14, Jan. 1986.

SAMPAIO, H. C.; et al. **AgNOR count in exfoliative cytology of normal**

buccal mucosa. Effect of smoking. Acta Cytol, Chicago, v.43, n.2, p.117-120, Mar/Apr 1999.

SAWYER, D. R.; WOOD, N. K. **Oral Cancer – Etiology, Recognition, and Management.** Dental Clin North Am, v.36, n.4, p.919-944, Oct 1992.

SILVERMAN, S. Epidemiology. Oral Cancer. 3th ed. Atlanta: The American Cancer Society; 1990. p. 1.

SOARES PINTO, T. A.; PHILIPPI C. K.; RADOS, P. V. **Avaliação citopatológica das alterações celulares prévias à lesão bucal visível.** Pesqui Odontol Brás, São Paulo, v.14, p.85, 2000. Suplemento.

SPEIGHT, P. M.; MORGAN, P. R. **The natural history and pathology of oral cancer and precancer.** Community Dent Health, Houndsmills, v.10, p.31-41, June 1993. Supplement 1.

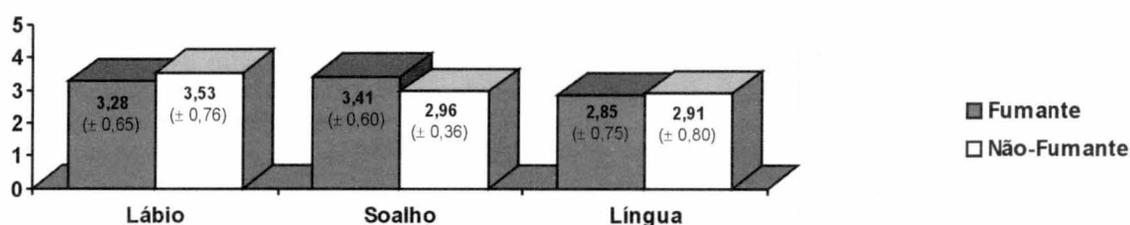
WHITAKER, S. B.; et al. **Giant cell lesions of the jaws: evaluation of nucleolar organizer regions in lesions of varying behavior.** J Oral Pathol

Med, Copenhagen, v.22, n.9, p.402-405, Oct. 1993.

Endereço para Correspondência:
Ramiro Barcelos, 2492 sala 503
Porto Alegre - RS
CEP: 90035-003
Telefone: (51) 3316-5011
E-mail: pantelis@ufrgs.br

Gráfico 1. Comparação entre a média do número de AgNORs por núcleo em relação ao grupo fumante e não-fumante nos diferentes sítios bucais estudados.

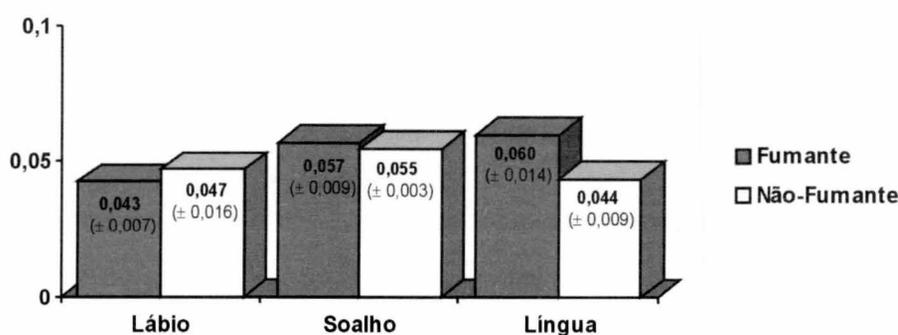
Média AgNORs/núcleo



Fonte: Pacientes atendidos durante a Campanha de Combate ao Câncer de Novo Hamburgo/RS, 2000.

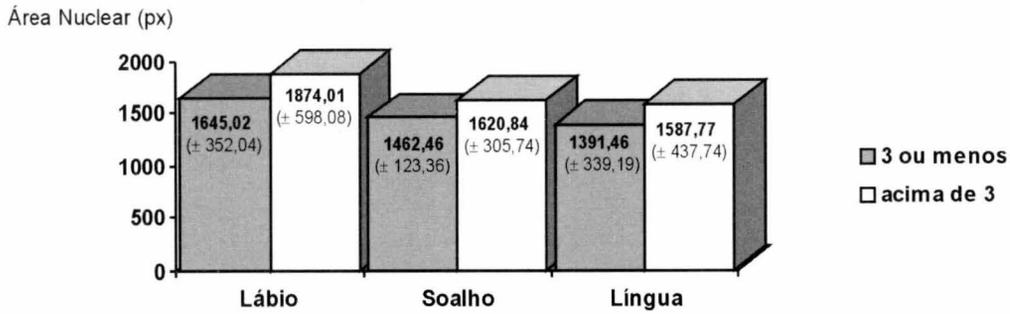
Gráfico 2. Comparação da relação núcleo/citoplasma (N/C) entre o grupo fumante e o não-fumante nos diferentes sítios bucais estudados.

Relação N/C



Fonte: Pacientes atendidos durante a Campanha de Combate ao Câncer de Novo Hamburgo/RS, 2000.

Gráfico 3. Relação entre número de AgNORs por núcleo e o respectivo tamanho de área nuclear (pixels).



Fonte: Pacientes atendidos durante a Campanha de Combate ao Câncer de Novo Hamburgo/RS, 2000.

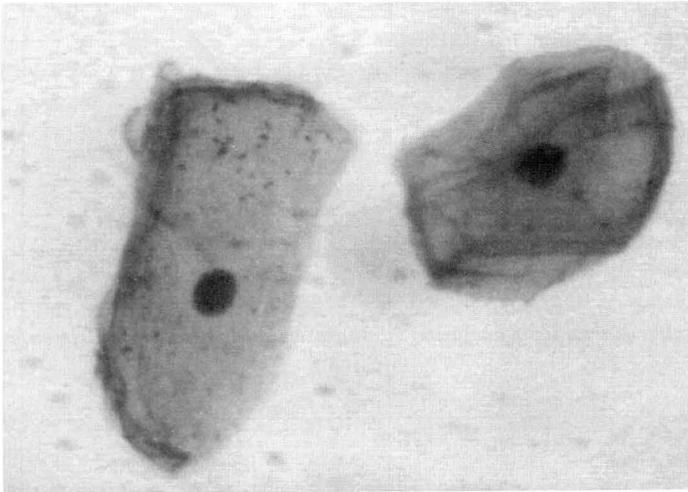


Figura 1. Fotomicrografia de esfregaço de lábio mostrando células epiteliais superficiais nucleadas (Classe I). Coloração de Papanicolaou Modificado. (400x)

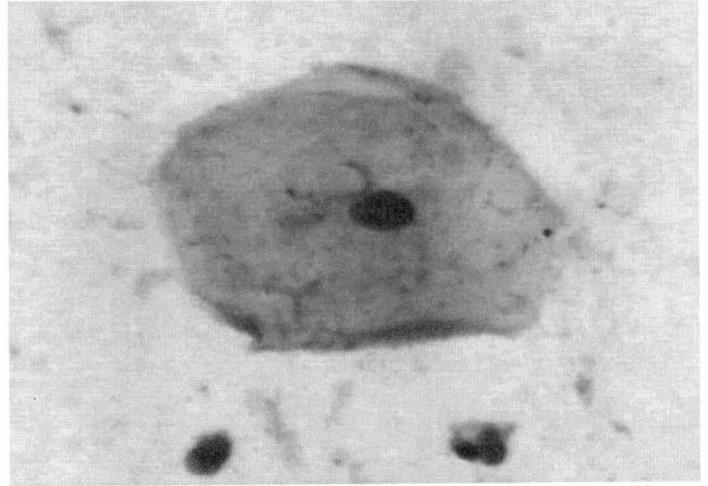


Figura 2. Fotomicrografia de esfregaço de lábio mostrando célula epitelial superficial nucleada com presença de células inflamatórias (Classe II). Coloração de Papanicolaou Modificado. (400x)



Figura 3. Fotomicrografia de célula atípica impregnada pela prata observada em esfregaço de soalho bucal de paciente fumante. Verifica-se a presença de 3AgNORs no interior da área nuclear e alteração da relação núcleo/citoplasma. Técnica de impregnação pela prata. (400x)