

OBSERVAÇÕES HISTOLÓGICAS SÔBRE O TECIDO ÓSSEO TRATADO COM O MÉTODO DE BODIAN DEPOIS DE DESCALCIFICAÇÃO ELETROLÍTICA

Instituto de Anatomia da Faculdade de Medicina de Pôrto Alegre
Departamento de Neuroanatomia

PAOLO CONTU *

ARMENIO DOS SANTOS FARIAS **

A descalcificação segundo os métodos clássicos com ácido clorídrico e nítrico deu sempre, nas mãos de técnicos experimentados, resultados bastante satisfatórios sem, porém, eliminar completamente os inconvenientes ligados à lentidão do processo e conseqüente permanência dos tecidos em ambiente fortemente ácido durante tempos muito longos (Romeis, 1; Celestino da Costa e Chaves, 2; Beccari, 3).

Lógicamente, as preocupações maiores derivam dos efeitos negativos deste tipo de descalcificação sobre tecidos delicados como o tecido nervoso, o neuroepitelio, células ósseas, etc....

Podemos ver como tôdas as tentativas de substituição ou modificação dos clássicos descalcificadores são mais ou menos orientadas para eliminar a ação prolongada dos ácidos fortes nos tecidos, e, assim, permitir a aplicação das técnicas histológicas adequadas.

Lembramos, as experiências com a associação de ácidos fortes com substâncias tipo fluoroglicinol tentada por Clapp (4); a associação de ácidos fortes com trinitrofenol experimentada por De Galanta (5); os métodos ao citrato de magnésio e de sódio usados por Kramer e Shipley (6), Schelling e Halpersohn (7), Evans e Karajan (8); a associação de ácidos fortes com ácidos fracos (ácido tricloroacético com ácido nítrico) experimentada por Mc Namara (9); a descalcificação em vácuo experimentada por Wilson (10),

Wilson (11), Contu e Pirodda (12), Kovacs (13); a descalcificação com ácido tricloroacético e álcool usada por Pearson e O'Neil (14), Powers (15), Ebling (16); a descalcificação em ácido fórmico com resinas trocadoras pelo processo da troca iônica ideado por Dotto, Paparo e Clarke (17) e usada por Rasmussen (18); o método de fixação simultânea e descalcificação em acetato de sódio com formalina tamponada ideado por Schmit (19); etc....

A utilização da descalcificação eletrolítica melhorou muito os resultados. Os trabalhos de Richman, Gelfand e Hill (20), Contu e Pirodda (12), Kovacs (13), Contu e Montenegro (21), Freire de Barros (22), Skaldin, Savtchenko e Popoff (23), Contu (24), etc.... concordam nos benéficos efeitos obtidos com a aplicação de métodos histológicos em material descalcificado eletroliticamente, atribuindo, em geral, as causas à escassa permanência que vai de um mínimo de 3-6 horas em temporais de gato (Contu e Pirodda) a máximos de 42-72 horas (Skaldin e col.) em ossos compactos. Estes tempos são diferentes, logicamente, por causa dos diversos líquidos descalcificantes usados pelos vários autores.

Na verdade, o método de Richman e col. recebeu várias críticas. Lillie e col. (25 e 26) com uma série de experiências executadas com controles, estabeleceram que a rapidez da descalcificação era atribuída somente ao aumento da tempera-

* Pesquisador e docente-livre.
** Acadêmico do IV ano da F.M.P.A.

tura. Observando que, com a mesma temperatura e quantidade de líquido descalcificante, o processo era cronologicamente igual, seja no osso descalcificado eletroliticamente como no osso descalcificado não eletroliticamente. Estas conclusões de Lillie foram confirmadas por Lucas (27) e Morris e Benton (28).

Celestino (29) recentemente, analisando os dados obtidos com suas experiências, conclue que a eletrólise age só indiretamente na descalcificação por meio da elevação da temperatura, agitação e diluição das várias soluções descalcificantes confirmando as críticas de Lillie e col.. Apesar disto, o método da descalcificação eletrolítica recebeu muitas confirmações, figurando como método eficaz nos recentes tratados de técnica histológica e histoquímica de Romeis (30) e Pearse (31). Sem dúvida nós nos encontramos perante dados bibliográficos que se opõem e, por isso, insistimos nas pesquisas sobre a descalcificação.

Continuando as pesquisas com a descalcificação eletrolítica com uma solução de ácido clorídrico a 4% e ácido fórmico a 5% com contróle constante da temperatura e seguindo modificações técnicas sugeridas por Contu (32), encontramos alguns dados interessantes no tecido ósseo de temporais humanos, de gatos e de cobaies com a aplicação do método de impregnação de Bodian modificado (33).

Transcrevemos o método por extenso:

1. Fixação em:

formol	5 cc.
ácido acético	5 cc.
álcool a 95°	90 cc.

Bons fixadores são também o de Del Rio Hortega e o de De Castro.

2. Inclusão em parafina ou celodina.

3. Cortes de 12 a 15 micra — desparafinar (quando incluído em parafina), e lavar em água destilada.

4. Colocar os cortes durante 12—48 horas a frio e no escuro em protargol a 1% (a 100 cc. de protargol juntam-se de 4 a 6 gramas de cobre eletrolítico). A solução é usada somente uma vez.

5. Lavar em água destilada e passar durante 10 minutos na seguinte solução:

água destilada ...	100 cc.
hidroquinona	5 g.
sódio sulfito	5 g.

6. Lavar durante uma hora em água destilada, virar em cloreto de ouro a 1%, ao qual juntam-se três gotas de ácido acético.

7. Lavagem em água destilada, passagem durante cinco minutos em uma solução de ácido oxálico a 1%. Deve-se conseguir uma coloração azul-avermelhada.

8. Lavagem em água destilada, desidratação e montagem em bálsamo.

A solução de protargol faz-se usando água destilada tamponada a um pH 3,8 da seguinte maneira: a 17 cc. de M/5 ácido acético juntam-se 3 cc. de M/5 $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$. Em um litro de água destilada usa-se 14 cc. deste tampão.

Em precedente nota (25), foi referido como o método de Bodian aplicado em material descalcificado eletroliticamente dava ótimos resultados nos tecidos ósseo, cartilaginoso e nervoso. Uma análise mais profunda das lâminas revelou-nos que o método dava imagens de tecido ósseo absolutamente superiores às aquelas obtidas com outros métodos.

Os osteócitos aparecem bem visíveis com os longos prolongamentos ramificados sendo alguns terminais, mas a maioria anastomosando-se entre si. Os núcleos aparecem muito claros no centro das células ósseas em forma ovoidal, ovalar ou fusiforme. Os condriosomas granulares ou em forma de bastão são claramente demonstráveis em todas as células como também nos prolongamentos (fig. n.º 1).

Com a aplicação do método de Bodian em material não descalcificado eletroliticamente, mas com a solução de

ácido clorídrico a 4% e ácido fórmico a 5% (descalcificação que, em geral, dura 3-4 dias nos temporais de gato e cobaio e mais tempo em temporais humanos) aparecem bem evidentes só os núcleos das células ósseas com escassos prolongamentos e sem uma visão clara dos condriosomas: tem-se a impressão de que os prolongamentos dos osteócitos retraíram-se porque não é possível observar dentro dos canaliculos um claro conteúdo protoplasmático (fig. n.º 2).

Não queremos emitir hipóteses sobre o verdadeiro mecanismo que permite obter resultados tão bons com o método de Bodian depois de descalcificação eletrolítica.

Limitamo-nos, nesta nota, à exposição dos resultados obtidos, mas pensamos que a presença do cobre eletrolítico na solução de Bodian desempenhe um papel importante só em presença de material eletroliticamente descalcificado, e é de nossa intenção continuar os estudos neste sentido.

Considerando que a finalidade principal da utilização do descalcificador eletrolítico é uma permanência limitada nos ácidos descalcificantes com a conseguinte possibilidade de obter imagens histológicas melhores, julgamos os nossos resultados bastante animadores.

Parece-nos que o estudo da descalcificação eletrolítica não deve ser limitada a uma análise do seu mecanismo: pode ter base a hipótese que a eletrólise seja um método indireto que acelera a descalcificação, mas o que sem dúvida é extremamente interessante é a constatação de que os resultados histológicos obtidos, são sempre melhores. A constatação enfim que a eletrólise não produz alterações como a hidrólise nos anima para a continuação das nossas pesquisas, com a finalidade de aplicar métodos histológicos e citológicos mais finos e métodos histoquímicos.

RESUMO

O autor expõe os bons resultados histológicos obtidos com a aplicação do Método de Bodian modificado em tecido ósseo descalcificado eletroliticamente comparando-os com os obtidos com o mesmo método em material não descalcificado eletroliticamente.

S U M M A R Y

The authors explain the good histological results by application of Bodian's methods in bone tissue descalcified by eletrolitical method, doing comparison with the results obtained by the same method in bone tissue no eletrolitic descalcified.

B I B L I O G R A F I A

- 1 — Romeis, B. — Técnica histológica — Editorial Labor Barcelona, 1928.
- 2 — Da Costa, C. e Chaves, P. R. — Manual de Técnica histológica-Portugalia Editôra, Lisbôa, 1943.
- 3 — Beccari, N. — Elementi di Técnica Microscopica — S.E.L. Milano, 1946.
- 4 — Clapp, M. P. — Am. journ. Tech. Meth. 1, 31-32, 1935.
- 5 — De Galanta, E. J. — Am. journ. Tech. Meth. 17, 72, 1937.
- 6 — Kramer e Shipley, R. — Science, 64, 484-485, 1927.
- 7 — Schelling, D. H. e Halpersehn, M. B. — Arch. of Path. 5, 835, 1928.
- 8 — Evans, N. e Karajan, A. — Arch. of Path. 10, 177, 1930.
- 9 — Mc Namara, W. L. — Journ. Lab. Clin. Med. 25, 847-875, 1940.
- 10 — Wilson, G. H. — Path. Bacter. 39, 531-533, 1934.
- 11 — Wilson, R. H. — Am. j. Clin. Path. (Tech. Suppl.) 12, 79, 1947.
- 12 — Contu, P. e Pirodda, E. — Otorinolaring. ital. XXXI, 42-47, 1952.
- 13 — Kovacs, G. — Clin. Odont. n.º 6, 1-3, 1952.
- 14 — Pearson, A. e O'Neil, S — Anatomical Record, 95, 3, 1946.

- 15 — Powers, M. M. — J. D. Res. 31, 385-392, 1952.
- 16 — Ebling, H. — Tese, Pôrto Alegre, 1957.
- 17 — Dotti, L. B., Paparo, C. P., Clarke, B. E. — Am. j. Clin. Path. 21, 475-479, 1951.
- 18 — Rasmussen, S. L. — Anat. Rec. 139, 465-469, 1961.
- 19 — Schmit, R. W. — Lab. Invest. 5, 306-307, 1956.
- 20 — Richman, I. M., Gelfand, M. e Hill, J. M. — Arch. of Path. 44-92, 1947.
- 21 — Contu, P. e Montenegro, D. — Anais Fac. Med. Univ. do Recife 15, 163-167, 1955.
- 22 — Freire de Barros, H. — Anais Fac. Med. Univ. do Recife 15, 169-175, 1955.
- 23 — Skaldin, P. V., Savtchenko, E. D., Popoff, M. R. — Resumo in Excerpta Med. Section I, 1957.
- 24 — Contu, P.; Arq. Inst. Anat. — Pôrto Alegre III, 67-69, 1958
- 25 — Lillie, R. D., Laskey, A., Greco, J., Burtner, H., Jones, P.: Amer. J. Clin. Path. 21/8, 711-722, 1951.
- 26 — Lillie, R. D.: Ed. Blakiston, New York, 1953.
- 27 — Lucas, R. B.: J. Path. Bact. 64/3, 654-657, 1952.
- 28 — Morris, R. E., Benton, R. E.: Amer. J. Clin. Path. 26/6, 579-603, 1956.
- 29 — Celestino D. Il Valsalva vol. XXXVI, fasc. 4, 209-215, 1960.
- 30 — Romeis B: Taschenbuch der Mikroskopische Technik, Ed. R. Oldenburg, München, 1954.
- 31 — Pearse, E.: Histochemistry theoretical and applied, Ed. Churchill, London, 1960.
- 32 — Contu, P., Arq. Inst. Anat. — Pôrto Alegre III, 71-72, 1959.
- 33 — Contu, P., Pirodda, E., Lipparini, R. — Monit. Zool. Ital. vol. LX, 61-68, 1953.

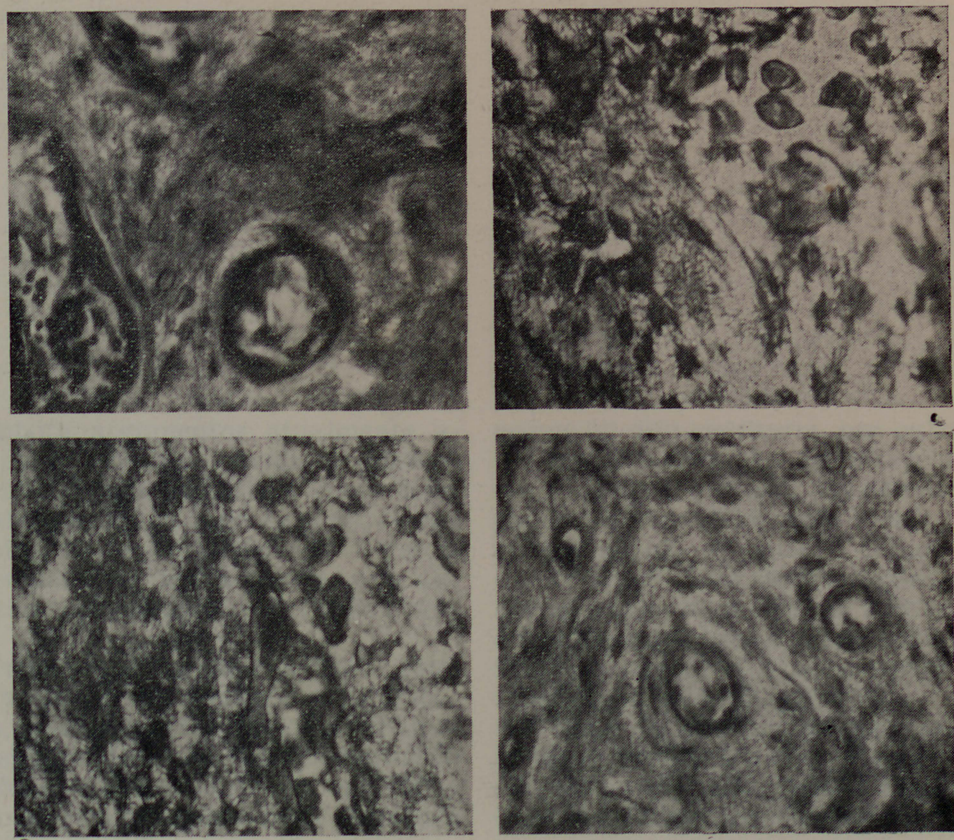


FIG. 1 — *Felis domestica*, osso temporal — Imagens de tecido ósseo descalcificado eletroliticamente. Aumento 5X, método de Bodian modificado

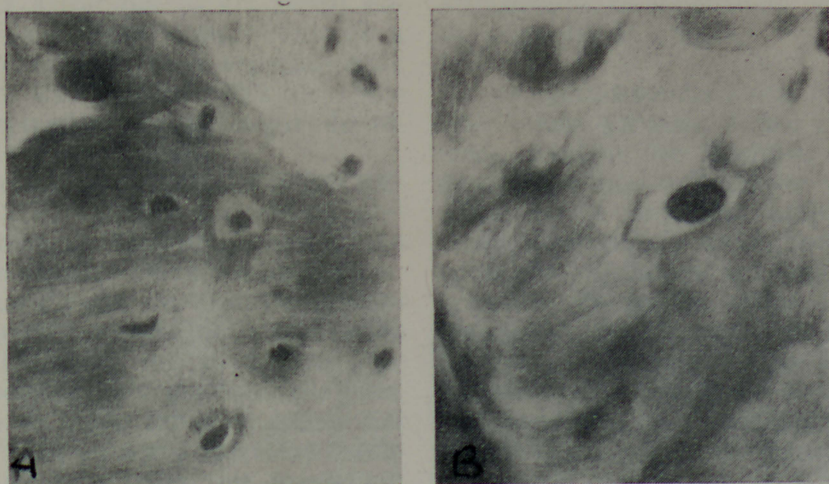


FIG. 2 — *Felis domestica*, osso temporal — Imagens de tecido ósseo não descalcificado eletroliticamente. Aumento: em A) 5X e em B) 8X, método de Bodian modificado