

**OBSERVAÇÕES TÉCNICAS SÔBRE A APLICAÇÃO DE
MÉTODOS HISTOQUÍMICOS PARA FOSFATASE
ALCALINA NO OSSO DEPOIS DA DESCALCIFICAÇÃO
ELETROLÍTICA (*)**

**CHAVES, J. M.
CONTU, P.**

Depois que Richman, Gelfand e Hill (1) em 1947 apresentaram o método de descalcificação eletrolítica, os estudos sôbre o assunto se desenvolveram muito rapidamente.

A finalidade do processo eletrolítico foi obter aceleração das reações que intervêm durante a descalcificação, determinando a ionização e a migração forçada do cálcio contido no tecido ósseo em forma de fosfato triplo, carbonato e outros sais insolúveis.

Desde o seu aparecimento o método foi modificado por muitos investigadores, quer em relação à natureza dos eléctrodos, fórmula e concentração das soluções descalcificantes e contrôle da temperatura. Lembramos os trabalhos de Ippolito (2), Contu e Pirodda (3), Kovacs (4), Freire de Barros (5), Contu e Montenegro (6), Celestino (7), Di Piramo (8), etc.

Alguns autores utilizaram o método para aplicações químicas, como um trabalho de Merlo (9) para dosagem química do cálcio nos ossos e sobretudo a investigação de Lillie e col. (10) que em uma série de experiências com contrôles estabeleceram que a rapidez da descalcificação eletrolítica era devida exclusivamente à elevação da temperatura pela passagem da corrente elétrica. Observaram que em paridade de temperatura e de quantidade de líquido descalcificante, o fenómeno de descalcificação do osso processava-se no mesmo período de tempo em cela eletrolítica e no contrôle.

(*) Trabalho realizado no Departamento de Neuro Anatomia com auxílio da Fundação Rockefeller.

Porém, o método eletrolítico é considerado eficaz nos recentes tratados de técnica histológica e histoquímica de Romeis (11) e Pearse (12).

Na presente nota analisaremos os primeiros resultados por nós obtidos com o emprêgo de alguns métodos para fosfatase alcalina em ossos descalcificados eletroliticamente.

MATERIAL E MÉTODOS

Para nosso estudo utilizamos ossos longos e curtos de ratos jovens e adultos sacrificados por sangria com anestesia etérea. Fragmentados os ossos e fixados imediatamente em álcool a 80° ou acetona pura a frio durante 24 horas para aplicação do método de Gomori para fosfatases alcalinas e álcool a 80° a frio para o método de Greep, Fisher e Morse.

Transcreveremos os métodos com as modificações introduzidas.

A — Método de Gomori para fosfatase alcalina:

- 1) Fixação de pequenos fragmentos (3-4 mm) em álcool a 80°. Alguns fragmentos eram fixados em acetona pura a frio a + 4°C durante 24 horas.
- 2) Descalcificação eletrolítica em uma solução de 75 cc de ácido fórmico a 5% e 75 cc de ácido clorídrico a 4%. A descalcificação era total em 1-2 horas com temperatura constante de $\pm 22^{\circ}\text{C}$.
- 3) Lavagem por 24 horas em água corrente.
- 4) Refixação em álcool ou acetona.
- 5) Cortes em congelação (7-10 micra).

Como contrôlo, alguns fragmentos foram desidratados, diafanizados, incluídos em parafina e cortados (7-10 micra).

Os cortes em congelação foram levados diretamente à incubação a 37° durante 3-24 horas na seguinte solução:

Beta-Glicero-fosfato de sódio a 2%	50 cc
Veronal sódico a 2%	50 cc
Água destilada	100 cc
Cloreto de cálcio a 2%	10 cc
Sulfato de magnésio a 2%	5 cc

Os cortes em parafina também foram incubados em igual período de tempo nesta mesma solução.

Testemunhos, tanto dos cortes em congelação como nos em parafina, foram incubados em uma solução em que o Beta-Glicero-fosfato foi substituído por água destilada.

- 6) Lavagem em água destilada.
- 7) Passagem em nitrato de cálcio a 2% durante 5 minutos.
- 8) Passagem em nitrato de cobalto a 2% durante 2-3 minutos.
- 9) Água destilada durante 1 minuto.
- 10) Passagem em sulfeto de amônio a 2% ou sulfeto de sódio a 2% durante 2 minutos.
- 11) Lavagem em água corrente durante 5-10 minutos.
- 12) Deshidratação e montagem em bálsamo.

B — Método de Greep, Fischer e Morse:

- 1) Fixação em álcool a 80° a frio.
- 2) Descalcificação eletrolítica como no método anteriormente descrito.
- 3) Lavagem por 24 horas em água corrente.
- 4) Refixação.
- 5) Cortes em congelação ou parafina como no método precedente.
- 6) Incubação e tratamento com a mesma técnica de Gomori.

CONSIDERAÇÕES

Queremos fazer algumas considerações de ordem técnica sobre a aplicação de métodos histoquímicos para fosfatase alcalina em osso depois de descalcificado eletroliticamente.

Lillie foi o primeiro que enfrentou problemas de ordem histoquímicos, apesar de suas conclusões não serem totalmente aceitas. Mantendo-se estável a temperatura durante a descalcificação eletrolítica, pode-se analisar os resultados de forma mais objetiva. Na verdade a fosfatase alcalina no osso assim descalcificado é demonstrável, assumindo papel fundamental os fatores ligados à fixação e à inclusão que são também muito importantes nos ossos descalcificados não eletroliticamente.

Abordaremos neste trabalho somente alguns aspectos, reservando para o futuro uma análise mais acurada, por se encontrarem as nossas pesquisas ainda em andamento.

Quanto à fixação obtivemos melhores resultados com acetona a + 4°C durante 24 horas. A fixação em álcool a

temperatura ambiente ou a frio não apresenta diferença marcante.

O tempo de incubação também merece ser considerado, apesar de ser analisado em relação ao método de inclusão.

A inclusão em parafina não conserva satisfatoriamente a atividade enzimática, provocando a dispersão da atividade fosfatásica; portanto o uso deste método deve ser tanto quanto possível limitado mesmo com um tempo de incubação reduzido entre 3-8 horas ao máximo. Outro aspecto negativo da inclusão em parafina é devido às imagens falsas que podem ser causadas pelo uso de albumina glicerínada.

O corte em congelação é o ideal para a evidencição da fosfatase alcalina, apresentando uma maior conservação da atividade enzimática em um tempo ótimo de incubação que varia de 3 a 8 horas.

Queremos, enfim, salientar os bons resultados obtidos com a substituição do sulfeto de amônio por sulfeto de sódio, que utilizamos por sugestão do dr. Fraga do Instituto de Química da URGs.

RESUMO

Os autores fazem algumas observações técnicas sobre o uso do método de Gomori e do método de Greep, Fischer e Morse para o estudo da fosfatase alcalina em fragmentos de ossos de ratos adultos e jovens depois de descalcificados eletroliticamente durante 1-2 horas, numa solução de 75 cc de ácido clorídrico a 4% e 75 cc de ácido fórmico a 5%.

A fixação em acetona pura a frio a + 4°C é melhor do que a fixação em álcool a 80°, como também os cortes em congelação são mais aconselháveis que os cortes em parafina, os quais podem dar imagens falsas devido ao emprego de albumina glicerínada.

SUMMARY

The authors made some technical observations about the use of Gomori method and Greep, Fischer and Morse methods for the study of alkaloidal phosphatase in fragments of bones. They used bones of rates in their first stage of life and adults, after eletrolyze descalcification during 1-2 hours in a mixture of 75 cc chloric acid at 4% and 75 cc of formic acid at 5%.

Fixing in pure acetona at +4°C is better than fixing in alcohol at 80°. Cuts in frozen material are also better then in parafin which can reproduce false images due to the use of glyceric albumin.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Richman, I. M.; Hill, J. M. — Method of descalcifying bone for histologic section — *Arch. Path.*, 44:92-95, 1947.
- 2) Ippolito, G. — Utile modificazione al metodo elettrolitico di descalcificazione delle ossa — *Ateneo Parmense*, 19: 44-47, 1948.
- 3) Contu, P.; Pirodda, E. — Il procedimento di descalcificazione elettrolitica nella indagine istologica del temporale — *Otorinolaring. Italiana*, 21(2):42-47, 1952.
- 4) Kovacs, G. — Sulla descalcificazione elettrolitica nella indagine istologica del dente — *Clinica Odontoiatrica*, 6: 1-3, 1952.
- 5) Freire de Barros, H. — Estudo sobre a descalcificação do dente — *Anais da Faculdade de Medicina da Universidade do Recife* — 15(2):169-175, 1955.
- 6) Contu, P.; Montenegro, H. — Descalcificação elettrolítica de ossos fixados em vários fixadores — *Anais da Faculdade de Medicina da Universidade do Recife*, vol. 15, n.º 2, 163-167, 1955.
- 7) Celestino, D. — Studio critico dell'impiego della descalcificazione elettrolitica nell'istologia del temporale — *Il Valsava*, 36(4):209-215, 1960.
- 8) Di Piramo, S.; Spangenberg, G. C. — Contribución al estudio de la descalcificación electroquímica de tejidos calcificados. Aplicación de la descalcificación dentaria — *Anales Fac. Odont. Uruguay*, 10:5-16, 1961-62.
- 9) Merlo, G. — Studio chimico e morfologico delle ossa mediante elettrolisi — *Biol. Latina*, 5:260-266, 1952.
- 10) Lillie, R. D.; Laskey, A.; Greco, J.; Burtner, H.; Jones, P. — Descalcification of bones in relation to staining and phosphatase technics — *Amer J. Clin. Path.*, 21 (8):711-722, 1951.
- 11) Romeis, B. — *Taschenbuch der mikroskopische technick* — Ed. R. Oldenburg, München, 1954.
- 12) Pearse, E. — *Histochemistry theoretical and applied* — Ed. Churchill, London, 1960.