

ESTUDO PRELIMINAR- DESCALCIFICAÇÃO DE TECIDO ÓSSEO DE ORIGEM ANIMAL EM MICRO-ONDAS

PRELIMINARY STUDY - MICROWAVE DECALCIFICATION OF ANIMAL BONE TISSUE

Marli Anágua

1 – Centro de Investigação em Ciências Veterinárias (CICV), Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Campo Grande, 376, 1749-024 Lisboa

Resumo:

Introdução: A análise histopatológica de tecido ósseo exige uma etapa de descalcificação. O método usual consiste na imersão das amostras em ácidos, mas para além de provocarem danos tecidulares, o processo é prolongado. A utilização de micro-ondas acelera a descalcificação, mas não deve comprometer a imagem microscópica.

Objetivo: Diminuir a duração da descalcificação, mantendo a qualidade da imagem microscópica.

Metodologia: Foram testadas amostras de osso compacto e esponjoso. Realizou-se a descalcificação pelo método convencional e pelo método em micro-ondas, através da adaptação de um protocolo conhecido. Utilizou-se ácido nítrico a 5% e 10%.

Resultados: Nos fragmentos de maiores dimensões, após 4 horas com ácido nítrico a 10% em micro-ondas, não se conseguiu uma descalcificação completa, apesar da imagem histológica ser razoável. Nos fragmentos de osso esponjoso, verificou-se uma redução de cerca de 25 horas relativamente ao método convencional. Nas biópsias, houve uma redução de aproximadamente 10 horas, utilizando ácido nítrico a 5%. Com ácido nítrico a 10% houve destruição tecidular. Nos casos em que se obteve uma descalcificação completa, a imagem microscópica apresenta fraca qualidade.

Conclusão: A utilização de micro-ondas com ácido nítrico a 5%/10%, aplicando o protocolo deste estudo, reduz a duração da descalcificação, mas compromete a imagem microscópica.

Palavras-chave: Infecção do trato urinário, antibioterapia, agente etiológico, resistência bacteriana, sensibilidade bacteriana.

Abstract:

Introduction: Histological analysis of bone tissue requires a decalcification process. The most common method consists on sample's immersion in acidic solutions. However, it causes tissue damage and is time consuming, delaying the diagnosis. The use of microwaves accelerates the decalcification process, but shouldn't compromise the histological image.

Objective: Reduce the decalcification time, maintaining the quality of the histological image.

Methodology: Compact and spongy bone were used. Decalcification was performed by conventional method and microwave method with an adaptation of a known protocol, using 5% and 10% nitric acid.

Results: For larger fragments, after 4 hours of microwave decalcification with 10% nitric acid, the process was incomplete for compact bone, in spite of moderate quality of histological image. In the fragments of spongy bone, there was a reduction of approximately 25 hours, comparing with conventional method. In biopsies, there was a reduction of approximately 10 hours using 5% nitric acid. With 10% nitric acid, there was tissue destruction. The cases with complete decalcification had a poor quality of the histological image.

Conclusion: The use of microwave decalcification with 5%/10% nitric acid, applying the protocol of this study, reduces the process time but compromises the histological image.

INTRODUÇÃO

A análise histopatológica de um tecido ósseo ou calcificado, exige uma etapa de descalcificação após a fixação, que permite a remoção dos sais de cálcio, necessária à obtenção de cortes neste tipo de amostras

(Bancroft, 2008). Um dos métodos mais comuns de descalcificação consiste em imergir as amostras em soluções ácidas. A escolha da solução descalcificadora depende da urgência do caso, do grau de mineralização da amostra e das técnicas de coloração requeridas, mas uma das soluções

mais utilizadas é o ácido nítrico, que tem um forte poder de penetração. Os ácidos provocam danos nos tecidos, principalmente no que diz respeito às suas afinidades tinturiais. Os seus efeitos negativos verificam-se especialmente na fraca basofilia nuclear, o que pode comprometer o correto diagnóstico. Quanto mais fortes forem as soluções ácidas e mais duradouro for o processo de descalcificação, mais se acentuam estes efeitos indesejáveis. Os processos de descalcificação convencionais são morosos, podendo demorar vários dias, ou semanas, o que atrasa significativamente a emissão dos relatórios histopatológicos (Bancroft, 2008). A utilização de micro-ondas (MW) na descalcificação já foi introduzida há alguns anos (Giberson and Demaree, 2001; Duarte et al, 2012).

Contudo, não existe uma aplicação generalizada à rotina hospitalar, e ainda menos no contexto da patologia veterinária. Através do aumento da temperatura, a utilização de MW acelera a descalcificação, mas não deve comprometer a estrutura tecidual e a imagem microscópica.

Assim, torna-se pertinente tentar reduzir a duração do processo mantendo a qualidade da imagem microscópica obtida em amostras de tecido ósseo animal.

Desta forma, o objetivo deste estudo consiste em diminuir a duração da descalcificação, sem prejudicar a imagem histopatológica.

MATERIAL E MÉTODOS

A variável independente deste estudo corresponde ao método de descalcificação aplicado e a variável dependente consiste na qualidade da imagem microscópica obtida. Foram testadas 20 amostras de tecido ósseo, provenientes de fémur de animais da espécie caprina. Desse total de amostras, 10 foram de osso compacto e as outras 10 de osso esponjoso. As amostras foram cortadas de forma a adquirirem dimensões que pretendessem simular casos de biópsias e casos de peças cirúrgicas ou necrópsias. Todos os fragmentos foram fixados em formol a 10% tamponado. Realizou-se a

descalcificação pelo método convencional e pelo método em micro-ondas. O método convencional consistiu na imersão das amostras em ácido nítrico a 10%, com agitação e controlo duas vezes por dia. O método em MW baseou-se na adaptação de um protocolo proposto por Madden e Henson (Giberson and Demaree, 2001), apresentado em seguida:

1. Colocar as amostras em cassetes num cesto que possa ir ao MW.
2. Pré-aquecer 300 ml de descalcificador (num recipiente de 600ml que possa ir ao MW) a 850W durante 25 segundos, sem o cesto com as cassetes.
3. Colocar o cesto com as cassetes na solução descalcificadora aquecida. Agitar o cesto para cima e para baixo cerca de 20 vezes.
4. Colocar o recipiente num banho de gelo e colocar do lado oposto um recipiente com 100 ml de água destilada.
5. Irradiar a 350W durante 15 minutos.
6. Retirar o recipiente do MW para uma área bem ventilada ou para uma hotte. Verificar se a descalcificação já está completa. Se não estiver, agitar o cesto com as cassetes para cima e para baixo cerca de 20 vezes.
7. Colocar de novo o recipiente no MW e irradiar a 500W durante 15 minutos.
8. Retirar o recipiente do MW para uma área bem ventilada ou para uma hotte. Verificar se a descalcificação já está completa. Se não estiver agitar o cesto com as cassetes para cima e para baixo cerca de 20 vezes.
9. Colocar de novo o recipiente no MW e irradiar a 600W durante 10 minutos.
10. Retirar o recipiente do MW para uma área bem ventilada ou para uma hotte. Verificar se a descalcificação já está completa. Se não estiver agitar o cesto com as cassetes para cima e para baixo cerca de 20 vezes.
11. Colocar de novo o recipiente no MW e irradiar a 350W durante 10 minutos.
12. Retirar o recipiente do MW para uma área bem ventilada ou para uma hotte e agitar o cesto com as cassetes para cima e para baixo cerca de 20 vezes. Verificar se a descalcificação já está completa. Caso tal

não se verifique, repetir o passo anterior até a descalcificação estar completa

13. Após a descalcificação, lavar os fragmentos em água corrente durante pelo menos 10 minutos.

Em cada ciclo o banho de gelo tem de ser renovado e a cada dois ciclos a solução descalcificadora deve ser substituída.

Para a descalcificação em MW utilizou-se ácido nítrico a 5% e 10%.

Após o processo de descalcificação, as amostras seguiram o processamento histológico e coloração hematoxilina-eosina de rotina, através dos protocolos já implementados no laboratório onde foi realizado o presente estudo.

O método de colheita de dados aplicado nesta investigação baseou-se na observação direta das lâminas ao microscópio ótico. A avaliação da qualidade da imagem microscópica obtida, foi realizada por um médico veterinário patologista.

RESULTADOS

Verificou-se que nos fragmentos de tecido ósseo compacto de maiores dimensões, não se conseguiu uma descalcificação completa para osso compacto, quer com ácido nítrico a 5%, quer a 10%, tendo sido testados um máximo de 20 ciclos, que corresponde a cerca de 4 horas. Considerou-se inviável do ponto de vista prático testar um número de ciclos superior, pois o trabalho presencial por parte do técnico durante tanto tempo acaba por não ser vantajoso. Contudo, nas porções de tecido em que foi possível obter cortes no micrótomo, a qualidade da imagem histológica foi razoável (figura 1a e 1b).

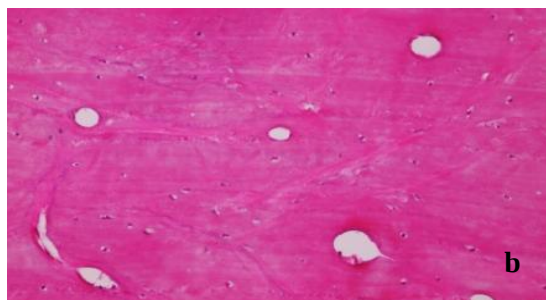
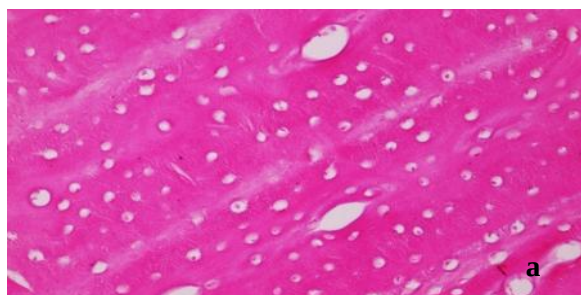


Figura 1 – Osso Compacto – Descalcificação Convencional (a) vs Descalcificação (b) em microondas. Qualidade da imagem microscópica razoável, apesar do processo não ter sido completo. Fraca basofilia nuclear. HE 100x.

Nos fragmentos de osso esponjoso, verificou-se uma redução de cerca de 25 horas relativamente ao método convencional, através da realização de 5 ciclos, com ácido nítrico a 5% (figura 2a e 2b).

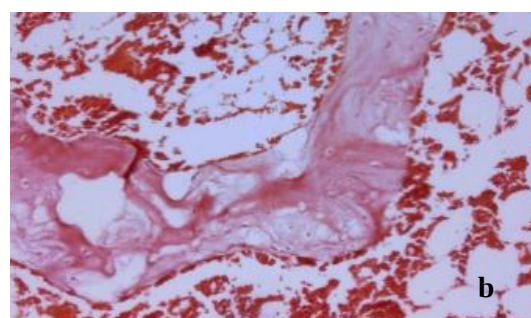
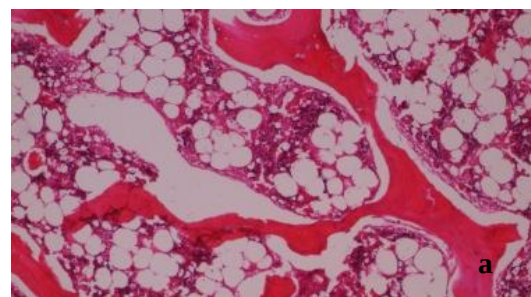


Figura 2 – Osso esponjoso – Descalcificação Convencional (a) Vs Descalcificação (b) em microondas. Destruição óssea. HE 100 X

Nas biópsias, houve uma redução de aproximadamente 10 horas, com a aplicação de apenas dois ciclos, utilizando também ácido nítrico a 5%. Contudo, em ambos os casos a imagem microscópica apresenta fraca qualidade (figura 3). A aplicação de ácido nítrico a 10% em MW nos fragmentos de

osso esponjoso e de biópsia provocou destruição tecidual.

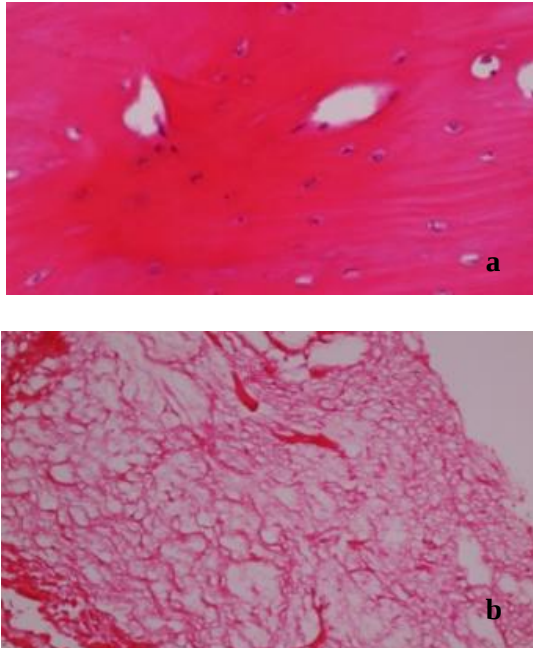


Figura 3 – Biópsias ósseas – Descalcificação Convencional (a) Vs Descalcificação (b) em microondas. Destruição óssea. HE 100X.

DISCUSSÃO

Desta forma, conclui-se que a utilização de micro-ondas na decalcificação com ácido nítrico a 5% ou 10%, aplicando o protocolo deste estudo em amostras de caprinos, reduz a duração do processo, mas compromete significativamente a imagem microscópica, o que se torna inviável para diagnóstico. Considera-se pertinente continuar esta investigação, testando outras soluções decalcificadoras, nomeadamente soluções comerciais, e adaptando o protocolo utilizado, até serem otimizados os resultados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bancroft, J. (2008); Theory and Practice of Histological Techniques (6th Edition). London. Churchill Livingstone, Elsevier.

Duarte A., Direito I., Ladeira C. Descalcificação em Microondas com Ácido Nítrico a 5% e RDO, Mícron: Revista Técnica de Anatomia Patológica, nº16, 2012.

Giberson R. T., Demaree Jr R.S. Microwave Techniques and Protocols, New Jersey: Humana Press Inc., 2001.