

DESCALCIFICAÇÃO

Prof. Carina Ladeira

Novembro de 2007



DESCALCIFICAÇÃO

- Existem tecidos que naturalmente possuem uma consistência pétrea (ex.: osso, dente)
- Existem tecidos que devido a alterações patológicas possuem calcificações (ex.: calcificações mamárias, prostáticas, etc.)
- Calcificação – deposição de sais de cálcio insolúveis num tecido

DESCALCIFICAÇÃO

- Os tecidos calcificados têm consistência pétreas e deste modo não podem ser cortados
- Para ser possível o corte é necessário usar substâncias capazes de dissolver o cálcio existente nos fragmentos
- Esta operação denomina-se de descalcificação

DESCALCIFICAÇÃO

- A descalcificação consiste num processo químico de eliminação dos sais de cálcio presentes nos tecidos, de forma a tornar possível o estudo histopatológico normal
- É importante referir que mediante o processo de descalcificação será impossível estudar muitas das características ósseas – técnicas especiais

MECANISMOS DE ACÇÃO DA DESCALCIFICAÇÃO

- Eliminação do cálcio através de um agente quelante
- Substituição por sais de sódio
- Utilização de resinas permutadoras de iões
- Electrólise
- Dissolução por um agente ácido

ELIMINAÇÃO DO CÁLCIO ATRAVÉS DE UM AGENTE QUELANTE

- Utiliza agentes quelantes – formam com o cálcio compostos não ionizáveis
- Há fixação de um íon metálico ao cálcio
- Processo lento e difícil mas menos prejudicial para os tecidos
- Exemplo: EDTA

ELIMINAÇÃO DO CÁLCIO ATRAVÉS DE UM AGENTE QUELANTE

- Excelente preservação do detalhe histológico
- O tamanho do fragmento para realizar este processo não pode exceder os 4 mm

SUBSTITUIÇÃO POR SAIS DE SÓDIO

- O cálcio é substituído pelo sódio
- O tempo requerido para este tipo de descalcificação é grande
- Utilizado mais em pequenas peças e osso esponjoso
- Sais sódicos + utilizados: citrato de sódio e hexametáfosfato de sódio 25%

RESINAS PERMUTADORAS DE IÕES

- Não são descalcificadores directos
- Utilizadas em conjunto com soluções ácidas
- Mantém o líquido fixador puro, fixando os sais de cálcio
- Permite acelerar o processo de descalcificação

RESINAS PERMUTADORAS DE IÕES

- São colocadas em camada com espessura de 1,5 cm no fundo do recipiente
- Contacto directo com o fragmento
- Os sais de cálcio ficam depositados nas resinas que se encontram no fundo do recipiente
- Impossibilitam a determinação do fim da descalcificação pelo processo químico

ELECTRÓLISE

- Constituído por um aparato electrolítico com eléctrodos positivo e negativo
- O fragmento a descalcificar é colocado no lado positivo
- Atracção exercida pelo ânodo (-) sobre os catiões cálcio (2+), com ajuda de uma solução ácida
- Solução de descalcificação constituída por Ácido clorídrico, Ácido fórmico e água destilada

DISSOLUÇÃO POR UM AGENTE ÁCIDO

- Consiste em imergir o fragmento a descalcificar numa solução ácida, designada de descalcificador
- Existem vários agentes ácidos que são considerados descalcificadores
- **Soluções descalcificadoras:** geralmente com função ácida, que em contacto com os sais de cálcio produzem combinações solúveis na água, eliminadas pela lavagem e/ou neutralizadas

DESCALCIFICADORES

Condições da solução descalcificadora:

- Eliminar totalmente os sais de cálcio presentes no tecido
- Não produzir destruição celular
- Não provocar artefactos
- Não deve interferir com as afinidades tinturiais
- Deve ser rápido

DESCALCIFICADORES

- Dependendo do tecido a descalcificar opta-se pelo tipo de descalcificador
- A velocidade da solubilização depende da dureza do osso a descalcificar
- Ácidos fortes para ossos compactos
- Ácidos fracos para ossos esponjosos e fragmentos pequenos

DESCALCIFICADORES

Ácidos fortes

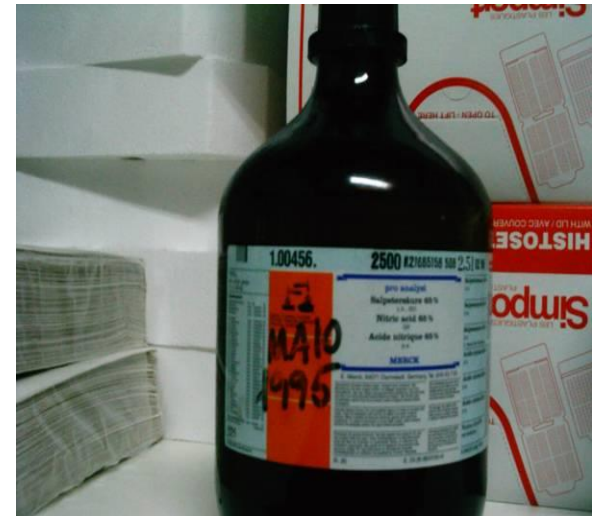
- Nítrico
- Clorídrico
- Tricloroacético
- RDO



DESCALCIFICADORES

Ácidos fracos

- Fórmico
- Sulfosalicílico
- Citrato de sódio



ÁCIDO NÍTRICO

- HNO_3
- É o mais utilizado
- Tem excelentes resultados, quer em rapidez, quer na conservação dos tecidos
- Utilizado para descalcificar peças grandes, porque penetra bem nos tecidos e é rápido
- Utiliza-se aproximadamente a 5% em solução aquosa

ÁCIDO NÍTRICO

- Máxima concentração: 30%
- Descalcificação superior a 48h, ocorre a formação de ácido nitroso (HNO_2) que pode prejudicar as colorações, nomeadamente nuclear
- Fragmentos com espessura entre 3-4 mm

ÁCIDO CLORÍDRICO

- HCL
- Descalcificador rápido
- Pode causar danos quando o tempo de aplicação exceder as 24 ou 48H
- Utilizado habitualmente a 5-10%

ÁCIDO TRICLOROACÉTICO

- Assegura a fixação ao mesmo tempo que a descalcificação

Solução

Ác. Tricloroacético 100%.....	10ml
Água.....	80ml
Formol.....	10ml

RDO

- Existem comercializadas soluções descalcificadoras sendo actualmente a mais difundida o RDO - Descalcificador Rápido de Osso
- É utilizado em peças pequenas e biópsias ósseas
- É rápido mas com pouco poder de penetração

RDO

- Tem uma actividade muito elevada - 6h à temperatura ambiente são suficientes para descalcificar uma pequena peça óssea
- Um erro no tempo de descalcificação pode ser fatal para a estrutura da peça a estudar

ÁCIDO FÓRMICO

- Dá bons resultados
- A descalcificação das peças demora entre 3 a 4 dias
- É pouco usado mas muito recomendado pela histoquímica
- Pode ser usado associado ao formol e ao citrato de sódio

REQUISITOS PARA UMA BOA DESCALCIFICAÇÃO

- Não existe um descalcificador perfeito
- O descalcificador é escolhido consoante o tipo de osso e o caso



REQUISITOS PARA UMA BOA DESCALCIFICAÇÃO

- Para uma descalcificação eficaz devem existir 4 condições:
 - Eliminação completa do cálcio
 - Ausência de danos no tecido
 - Preservação das afinidades tinturiais
 - Rapidez adequada

ELIMINAÇÃO COMPLETA DO CÁLCIO

- A descalcificação deve ser o mais completa possível
 - ▶ Para um bom corte histológico
- Má descalcificação ▶
Impossível obter um corte



AUSÊNCIA DE DANOS NOS TECIDOS

- Os agentes descalcificadores mais usados são os ácidos
- Cuidado com a concentração e o tempo de utilização
- Formol + líquido descalcificador ► Redução dos danos causados pelo ácido
- Nos tecidos bem fixados os danos dos ácidos são menores

PRESERVAÇÃO DAS AFINIDADES TINTURIAIS

- Alguns dos descalcificadores – ácidos – modificam a química dos tecidos extraíndo ou alterando certas substâncias que impossibilitam ou dificultam a coloração dos tecidos
- A pós-fixação (24h), origina uma coloração mais brilhante

RAPIDEZ ADEQUADA

- A descalcificação não deve ser acelerada para serem evitados danos nos tecidos
- O descalcificador ideal não existe

CUIDADOS A TER NA ESCOLHA DE UM DESCALCIFICADOR

Descalcificadores:

Lentos – preservam a estrutura proteica dos tecidos e as afinidades tinturiais e particularidades histoquímicas

Rápidos – provocam alterações por vezes irreversíveis nos tecidos calcificados e subjacentes

FUNDAMENTOS GERAIS DA TÉCNICA

- Os fragmentos que irão ser submetidos ao processo de descalcificação devem ser cortados o mais fino possível – não deve ultrapassar os 5 mm
- A descalcificação deve ser realizada sempre depois da fixação
- Só depois de fixada é que se corta os fragmentos para descalcificar

FUNDAMENTOS GERAIS DA TÉCNICA

- As fatias podem ter uma grande superfície, contudo devem sempre ter pouca espessura com a finalidade de se obter uma descalcificação homogénea independentemente da densidade do tecido
- Tecido fino – descalcificação + rápida

FUNDAMENTOS GERAIS DA TÉCNICA

- Maior concentração de ácido diminui o tempo de descalcificação mas, também diminui a qualidade de preservação dos tecidos
- Renovar constantemente o líquido descalcificador (de forma a manter a concentração inicial)
- A descalcificação deve ser controlada, assiduamente para evitar danos irreversíveis

FUNDAMENTOS GERAIS DA TÉCNICA

- Depois da descalcificação é necessário remover o descalcificador, podendo ser feito por lavagem em:
 - Água
 - Álcool a 70%
 - Sulfato de sódio
 - Etc.

FACTORES QUE INFLUENCIAM A DESCALCIFICAÇÃO

- Concentração do descalcificador
- Volume da solução descalcificadora
- Temperatura
- Agitação
- Vácuo
- Tempo

CONCENTRAÇÃO DO DESCALCIFICADOR

- Maior concentração de ácido, acelera a descalcificação e aumenta os danos tecidulares
- Menor concentração de ácido, diminui o tempo de descalcificação e os danos nos tecidos

VOLUME DA SOLUÇÃO DESCALCIFICADORA

- A combinação do cálcio com o descalcificador vai promover a diminuição da concentração inicial da solução
- O descalcificador deve ser renovado todos os dias
- Deve-se usar um grande volume de descalcificador (40X o volume do fragmento)

TEMPERATURA

- Quanto maior a temperatura maior a velocidade da descalcificação
- Aumenta os danos nos tecidos
- Manifesta-se numa coloração menos intensa, especialmente nos núcleos
- A temperatura da descalcificação não deve exceder os 37°C

AGITAÇÃO

- A agitação não provoca efeitos na velocidade da descalcificação
- Contudo, deve-se agitar os fragmentos a descalcificar 1 a 2X por dia para evitar a formação de artefactos (cristais)

VÁCUO

- O vácuo não provoca efeitos na velocidade da descalcificação
- Facilita a evacuação de bolhas que são produzidas pela reacção dos sais de cálcio com o ácido descalcificador

TEMPO

- A variável tempo está condicionada por vários factores, principalmente a concentração do descalcificador
- Depende sobretudo do tipo de acção do descalcificador
- Deve-se controlar o processo de descalcificação para verificar o seu fim

PROCESSOS PARA DETERMINAR O FIM DA DESCALCIFICAÇÃO

- O final da descalcificação é difícil de determinar
- Os fragmentos ósseos raramente são homogêneos
- Apesar de completamente descalcificado o tecido ósseo permanece duro

PROCESSOS PARA DETERMINAR O FIM DA DESCALCIFICAÇÃO

- Determinar o final da descalcificação é muito importante, uma vez que este é um processo agressivo para os tecidos
- Existem processos químicos e mecânicos

PROCESSO QUÍMICO

- Difere dos processos mecânicos porque a pesquisa de existência de cálcio não se faz no fragmento mas sim no líquido descalcificador
- Este método não pode ser utilizado quando são utilizadas as resinas de intercâmbio iônico, soluções nítricas e clorídricas

PROCESSO QUÍMICO

- Retirar 5 ml de líquido descalcificador
- Neutralizar com Hidróxido de amónia ou de sódio
- Juntar em seguida 1 a 2 ml de Oxalato de amónia ou sódio a 5%
- Turva se possuir cálcio
- A descalcificação continua + 5'
- Se a solução continuar turva a descalcificação está completa

PROCESSO MECÂNICO

Podem ser por:

- Torção
- Picar com uma agulha
- Corte com bisturi
- Pesagem
- Sonoridade
- Radiografia

TORÇÃO

- Consiste na torção ligeira do fragmento para verificar a sua flexibilidade
- Se oferecer resistência: o fragmento não está suficientemente descalcificado, é necessária prosseguir com a descalcificação (renovar o descalcificador)
- Esta técnica é pouco recomendada porque pode quebrar o fragmento

PICAR COM AGULHA

- Com auxílio de uma agulha pica-se o tecido em várias direcções
- As zonas com resistência assinalam as calcificações
- É um processo violento para o tecido
- No caso das biópsias, para proceder à sua palpação é recomendado

CORTE COM BISTURÍ

- Tenta-se cortar o fragmento com o bisturi
- Se oferecer resistência a descalcificação deverá prosseguir
- Este método não lesiona os tecidos
- É o método de verificação mais utilizado
- Elimina a zona danificada pela serra

PESAGEM

- A pesagem regular das peças indica-nos o decorrer da descalcificação
- Este método é exclusivo para peças grandes

SONORIDADE

- Consiste em bater no fragmento com uma agulha ou bisturi
- Se o som produzido for metálico, a descalcificação deve prosseguir

RADIOGRAFIA

- Consiste em radiografar a peça
- Na radiografia as zonas calcificadas são reveladas por zonas opacas
- É o método mais fiável para determinar o fim da descalcificação
- Pouco cómodo porque nem todos os laboratórios dispõem de serviços de radiologia acessíveis
- Não é viável em fragmentos fixados com cloreto de mercúrio porque ficam opacos ao raios x

EFEITOS SECUNDÁRIOS DA DESCALCIFICAÇÃO

- A utilização de ácidos mesmo diluídos altera e danifica os tecidos

Tem efeitos sobre a coloração:

- Extracção dos ácidos nucleicos – origina uma diminuição da basófilia
- Extracção do ferro tecidual – o ferro solubiliza-se o que dificulta a avaliação da hemossiderina nos tecidos

EFEITOS SECUNDÁRIOS DA DESCALCIFICAÇÃO

- Alteração do glicogénio – não se pode avaliar quando se utiliza o EDTA
- Inactivação das enzimas – algumas substâncias só são evidenciadas pela sua actividade química, sem ela torna-se impossível evidenciá-las

UTILIZAÇÃO DA DESCALCIFICAÇÃO

Fragmentos recebidos que contenham sais de cálcio na sua constituição:

- **Biópsias:** ósseas, mamárias, prostáticas
- **Peças:** mandíbula, recessão de costelas, amputações

UTILIZAÇÃO DA DESCALCIFICAÇÃO

Tecidos incluídos em parafina:

- Desbasta-se o bloco até à superfície do tecido estar em contacto com o ar
- Coloca-se o descalcificador durante 3 a 4h
- Ácido clorídrico ou RDO
- Os 1ºs 20-30 cortes estão descalcificados
- Depois o bloco deve ser muito bem lavado de modo a não oxidar a faca

RESUMO

- Descalcificação – conceito
- Mecanismos de acção da descalcificação
- Descalcificadores
- Requisitos para uma boa descalcificação
- Fundamentos gerais da técnica
- Factores que influenciam a descalcificação
- Processos para determinar o fim da descalcificação
- Efeitos secundários da descalcificação
- Utilização da descalcificação