

SÔBRE A DESCALCIFICAÇÃO ELETROLÍTICA E SUA APLICAÇÃO NO ESTUDO HISTOLÓGICO DA CÓCLEA (*)

PAOLO CONTU, RENATO R. OHLWEILER, JOSÉ M. CHAVES

INTRODUÇÃO

O estudo histológico do tecido ósseo tanto humano como de animais apresentou sempre grandes dificuldades, devido aos métodos de descalcificação. Estas dificuldades tornam-se mais evidentes quando, além do estudo do tecido ósseo em si, interessam as análises de outros tecidos, tais como o nervoso e neuro-epitelial. Interessados no estudo da cóclea, tivemos oportunidade de experimentar vários métodos de descalcificação e de compará-los com o método eletrolítico, que, ultimamente, está sendo bastante utilizado.

Sabe-se que os métodos clássicos de descalcificação apresentam um lado negativo em consequência do longo tempo de descalcificação e, portanto com possibilidade de graves alterações nos tecidos pelo contato prolongado com os ácidos descalcificantes, impossibilitando a aplicação proveitosa de alguns métodos histológicos.

O método da descalcificação eletrolítica, ao contrário, apresenta a possibilidade de eliminar contatos muito prolongados com os ácidos descalcificantes.

Durante os estudos e pesquisas sobre a descalcificação eletrolítica, tivemos oportunidade de experimentar vários métodos histológicos com resultados que comprovam as vantagens auferidas pela eletrólise.

Precedida por ampla revisão bibliográfica vamos apresentar os resultados de nossas experiências.

LITERATURA

Um assunto tão complexo como o da descalcificação necessita ser analisado gradualmente, partindo de métodos que podemos chamar de clássicos para passar depois à literatura que trata dos métodos especiais.

Romeis (1) define a descalcificação como sendo "a prévia eliminação de sais calcáreos alojados em sua substância fundamental". A descalcificação é feita pelo tratamento do tecido ósseo por ácidos, que libertam os sais calcáreos. Por conseguinte, os compostos calcáreos insolúveis em água existente no osso são substituídos por outros que são solúveis em água ou álcool, facilitando, desta maneira, sua eliminação.

O autor é de opinião que a descalcificação deve ser precedida de uma fixação. Cita uma série de fixadores, não incluindo o ácido pícrico e tricloroacético por serem também descalcificadores.

A descalcificação verifica-se com diferentes líquidos que são renovados diariamente, variando também a sua duração em relação ao material tratado e o líquido descalcificador.

Após a descalcificação deve-se lavar a peça cuidadosamente e fazer a inclusão em parafina ou celoidina.

Entre os líquidos descalcificantes mais importantes, indica o ácido nítrico a 5%, como o melhor e mais rápido, descalcificando em 10 horas uma quantidade de 0,4 g de osso, por mais compacto que seja, ácido sulfuroso em solução aquosa saturada a 5%, chamando a atenção de que a descalcificação com êle é mais len-

(*) Trabalho realizado no Departamento de Neuro-Anatomia com auxílio da Fundação Rockefeller e do Conselho Nacional de Pesquisas.

ta que com o ácido nítrico; a solução de cloreto de sódio e ácido clorídrico de Ebner que demonstra bem a estrutura fibrilar e laminar do tecido ósseo, mas prejudica, profundamente, as estruturas celulares; pouco recomendável é o ácido clorídrico; o ácido tricloraocético em solução aquosa a 5% descalcifica bastante rapidamente ao mesmo tempo que fixa o material; o ácido pícrico é usado em solução aquosa concentrada, mas descalcifica muito lentamente e por isso é utilizado em material embrionário e ossos de animais jovens; um descalcificante mais rápido é o ácido picronítrico.

Da Costa e Chaves (2) consideram a descalcificação como "um método cuja finalidade consiste em desembaraçar dos sais calcáreos os tecidos que os contém (ossos e dentes)".

Aconselham a descalcificação depois de fixação com ácido nítrico diluído em álcool a 5% ou em água em proporções que vão de 2 a 15% conforme os casos. Outro descalcificador recomendado é o anidrido sulfuroso em solução aquosa a 5%. Os autores insistem ainda na possibilidade de, tratando-se de peças pequenas, descalcificá-las no próprio fixador como é o caso do líquido de Fleming (ácido crômico e ácido acético), líquido de Susa (ácido tricloraocético e acético), etc. . .

Fernandes (3) diz que qualquer ácido suscetível de fornecer sais de cálcio ou magnésio solúveis em água poderá ser utilizado, empregando-se geralmente, os ácidos nítrico, clorídrico, fórmico, tricloraocético, pícrico, etc. . . Em relação ao ácido nítrico afirma que não causa entumescimento dos tecidos e as melhores colorações são obtidas em cortes de materiais por êle descalcificados, provavelmente devido ao seu elevado potencial de oxidação; o ácido clorídrico é o mais usado e mesmo em soluções muito diluídas tem ação rápida, mas produz entumescimento apreciável dos tecidos; êste inconveniente pode ser evitado até certo ponto diluindo em álcool ou combinando com ácido crômico ou adicionando sulfito de sódio a 5-10%; o ácido fórmico é empregado em solução a 5% aquosa ou alcoólica, ou em mistura com o formol a 10-20%; o ácido pícrico, descalcificando muito lentamente, é aconselhado em so-

lução aquosa saturada para descalcificação de tecidos embrionários; o ácido tricloraocético é empregado em geral na percentagem de 5% em mistura com o líquido fixador (formol) a 10%. O autor diz que, em geral, a inclusão em celoidina é preferível.

Beccari (4) aconselha o ácido nítrico em solução aquosa a 5%, quando se trata de ossos de adultos, e a 1%, quando fôr ossos fetais, sempre depois de boa fixação.

O autor afirma que peças pequenas descalcificam entre 5 e 10 dias, devendo ser renovado o líquido pelo menos 3 vezes. Cita, outrossim, o uso de alguns líquidos fixadores que são contemporaneamente descalcificantes como é o de Fleming.

Para estudar as estruturas finas do dente ou osso êle indica o ácido clorídrico salgado de Ebner, cuja fórmula é a seguinte: a 100 cc de solução saturada aquosa de cloreto de sódio juntam-se 100 cc de água e 4 cc de ácido clorídrico. Cada 2 ou 3 dias acrescentam-se 2 cc de ácido clorídrico até que o osso fique flexível, passando, depois, à lavagem e inclusão preferivelmente em celoidina ou celoidina-parafina. O autor salienta também que em geral a fixação é fundamental no processo de descalcificação, afirmando que, quando existe boa fixação, o ácido nítrico não altera a estrutura dos tecidos.

Gomori (5) diz que a descalcificação dos tecidos através de procedimentos regulares destrói tôdas as fosfatases. Lorch e Greep, Fischer, Morse afirmam que pequenos pedaços de ossos podem ser descalcificados após fixação em álcool, em um citrato tampão a pH 4,4-5 (exposto durante alguns dias). Após a descalcificação, o tecido é reativado a pH em torno de 9 (tampão Barbitol), desidratado, incluído. Até que ponto a enzima é preservada não foi determinado, mas nenhuma atividade autoriza a permitir a localização por métodos comuns.

Lison (6) aborda indiretamente a descalcificação, quando trata dos métodos destinados, especialmente, para demonstração dos sais insolúveis de cálcio (fosfato e carbonato).

Refere-se ao método original ar-
gêntico de Von Kossa que usa como fi-

xador formol sublimado e álcool, ao método de Gomori que descalcifica durante um a três dias no ácido sulfosalicílico a 6-8% e desaconselha o uso de ácido nítrico porque dissolve a prata.

Lillie (7), no seu livro de técnica histopatológica e histoquímica prática, é o primeiro tratadista a referir-se às pesquisas sobre descalcificação eletrolítica que já começam a ser conhecidas e usadas sobretudo pelas vantagens que o método apresenta, especialmente reduzindo a poucas horas a permanência do tecido ósseo nos ácidos descalcificantes. Devido ao fato dos métodos normais de descalcificação dificultarem a aplicação das técnicas histológicas, bem como de expor as peças aos ácidos descalcificadores por muito tempo, a descalcificação eletrolítica suscitou um grande entusiasmo nos meios científicos.

O autor, possuindo experiência por ter controlado o método no próprio laboratório, afirma que a rapidez da descalcificação eletrolítica era consequência unicamente à elevação da temperatura.

Montaldo (8), analisando amplamente o problema da descalcificação, considera bons descalcificadores o ácido nítrico a 5-25%, o ácido clorídrico a 5-10%, o ácido fórmico a 3-33% (sobretudo na descalcificação dos dentes) e o ácido pícrico em solução saturada a frio.

Na descalcificação eletrolítica propõe as seguintes soluções descalcificantes: ácido clorídrico a 8% mais ácido fórmico a 10% em partes iguais ou ácido tricloroacético a 5% com formol em partes iguais. Devido à elevação da temperatura (40-45°C) durante a eletrólise, sugere uma adequada refrigeração.

Pearse (9) também é favorável ao método de descalcificação eletrolítica e no seu tratado recente de histoquímica aplicada e teórica considera-o eficaz; da mesma opinião é Romeis (10) na última edição do seu tratado sobre técnicas histológicas.

A revisão bibliográfica da literatura especial, embora contraditória, evidencia em geral a preocupação dos pesquisadores em obter um método rápido e que ofereça uma margem de segurança razoável na aplicação dos métodos histológicos.

Sabe-se que a descalcificação é ob-

tida emergindo a peça previamente fixada em solução de ácidos ou de sais capazes de constituir compostos de cálcio solúveis em água e que a velocidade de descalcificação dos vários ácidos ou sais é diretamente proporcional à solubilidade do composto que substitui, bem como à superfície da peça e inversamente proporcional à sua massa.

A descalcificação, segundo os métodos clássicos com ácido clorídrico e nítrico, como já demonstramos nesta revisão bibliográfica, proporcional na nas mãos de técnicos experimentados, resultados satisfatórios; entretanto, sem eliminar completamente os três inconvenientes: a) lentidão do processo de descalcificação, ligada à escassa solubilidade dos sais de cálcio do líquido descalcificante com pH muito baixo que impõe troca contínua do líquido; b) retardamento da aplicação da técnica histológica; c) permanência da peça por um tempo muito longo em ambiente fortemente ácido, trazendo conseqüentemente, alterações profundas, tanto nas características tintoriais dos métodos histológicos como na estrutura morfológica do tecido.

Os efeitos negativos deste tipo de descalcificação não se refletem só no tecido ósseo, mas com muito mais evidência no tecido nervoso, neuroepitélio, etc.; portanto, a sua aplicação, determina profundas modificações em certas peças, como a cóclea.

Daí, conclui-se que as tentativas de substituição ou modificação dos clássicos descalcificantes são orientados no sentido de reduzir o tempo de descalcificação, evitar a ação prolongada dos ácidos fortes nos tecidos e assim, permitir a aplicação das técnicas histológicas adequadas.

Lembramos os esforços realizados por Clapp (11), que associava ácidos fortes com substâncias tipo fluoroglicinol; De Galanta (12) que usou sem grandes resultados a associação de ácidos fortes com trinitrofenol; Kramer e Shippley (13) que usaram o método do citrato de magnésio.

Jaffé (14), em uma revisão de métodos para o estudo do tecido ósseo, afirma que o ácido fórmico não é um agente satisfatório por sua tendência em produzir entumescimento das fibras.

Evans e Krajian (15), discordando das afirmativas de Jaffé, declaram ter conseguido uma ótima descalcificação com uma solução em partes iguais de 85% de uma solução aquosa de ácido fórmico e 20% de uma solução aquosa de citrato de sódio, usada depois de fixação comum em solução de formaldeído ou de um fixador padrão. O tempo para descalcificação poderá variar de poucas horas até 3 a 4 dias, dependendo das características do tecido e do tamanho da peça.

Mac Namara (16) experimentou a associação de ácidos fortes com ácidos fracos (ácido tricloroacético mais ácido nítrico).

Um bom método de rápida descalcificação é o usado por Wilson (17), cuja técnica é a seguinte: 1.º fixação em formalina a 10%; 2.º lavagem em água corrente; 3.º passar na série dos álcoois e depois na mistura de álcool absoluto-éter durante 2 horas; 4.º passagem em éter; 5.º passagem em álcool-éter e depois nos álcoois decrescentes; 6.º lavagem em água corrente; 7.º descalcificação em solução a 20% de ácido nítrico ao vácuo; 8.º tratar com solução aquosa de carbonato de lítio ao vácuo; 9.º lavagem em água corrente durante 12 horas e 10.º inclusão em parafina ou celoidina.

Outro método de descalcificação é o descrito por Powers (18), modificando a técnica histológica de Ungewitter usada para dentes, que consta do seguinte: 1.º fixar por 3 ou mais dias na solução composta de: a) solução aquosa saturada de ácido pírico, 75 ml; b) formalina a 37%, 25 ml e c) ácido tricloroacético, 1 gr; 2.º lavagem em água corrente por uma noite ou 24 horas; 3.º descalcificar em solução a 5% de ácido tricloroacético em álcool a 50%; 4.º depois lavar em água corrente por 24 horas; 5.º desidratar por 24 horas, vagorosamente, em álcool a 30%, 50% e 70% durante 48 a 72 horas em álcool a 95% mais ácido n-butílico em partes iguais e depois em álcool n-butílico por 48-72 horas; 6.º inclusão em parafina.

Ebling (19), estudando a inervação do periodonto de incisivo inferior do rato e Louro (20), a inervação da polpa dentária e da dentina, empregaram a mo-

dificação proposta por Powers com bons resultados na descalcificação do dente.

Dotti, Paparo e Clarke (21) usaram a descalcificação em ácido fórmico com resinas trocadoras pelo processo de troca iônica, método que foi também usado com bons resultados por Rasmussen (22) na descalcificação do órgão da audição.

Schmit (23) idealizou um método que permite obter descalcificação em 24-48 horas com o uso de uma solução de "disodium Versenate" e formalina, obtendo contemporaneamente fixação e descalcificação do tecido.

Richmann, Gelfand e Hill (24) foram os primeiros a aplicar o procedimento eletrolítico para obter o aceleração das reações que intervêm durante o processo de descalcificação. O princípio do método é determinar a ionização e a migração forçada do cálcio do tecido ósseo, o que é obtido ligando a peça ao anódio num banho eletrolítico. Os autores experimentalmente excluíram o uso de substâncias oxidantes, como os nitratos e cromatos, por destruírem rapidamente a substância orgânica. Também os ácidos orgânicos e os seus sais demonstraram lentidão no processo de descalcificação pela escassa ionização que possuem. Os ácidos inorgânicos não oxidantes, fortemente ionizáveis, forneceram melhores resultados e muito satisfatórios foram os obtidos com uma solução de ácido clorídrico a 8% e de ácido fórmico a 10%, conseguindo-se descalcificação completa entre 2 e 6 horas, desaconselhando concentrações mais altas.

A documentação fotográfica dos resultados obtidos em um fragmento de esterno de 1 cm de espessura, descalcificado em 3 horas revela ótima conservação e coloração dos tecidos, particularmente, dos elementos da medula óssea.

Ippolito (25) modificou o método original de Richman e col., usando uma solução de ácido clorídrico a 2% e ácido tricloroacético a 3% com eletrodos de mercúrio e carvão; o eletrodo de mercúrio fixaria o cálcio, como amálgama.

LILLIE (26), em uma série de experiências com controles, estabeleceu que a rapidez da descalcificação eletrolítica era devido unicamente à elevação da temperatura pela passagem da corrente elétrica, observando que o aumento da

temperatura e da quantidade do líquido descalcificante não influía no tempo da realização do processo.

Merlo (27) usou a modificação de Ippolito para a dosagem química do cálcio nos ossos.

Contu e Pirodda (28) experimentaram a descalcificação eletrolítica em ossos temporais de cobaio, gato e cão, usando praticamente as modalidades técnicas sugeridas por Richman e col. que consistem em banho eletrolítico em uma solução de ácido fórmico a 5% e ácido clorídrico a 4%, usando corrente contínua de 3 a 4 volts e 0,2 ampères. Dêste modo obtiveram descalcificação completa em 3 a 6 horas. As preparações histológicas de tecido ósseo, cartilaginoso, elementos neuroepiteliais, sustentação e fibras nervosas se apresentaram com imagens satisfatórias e sempre superiores às obtidas com os métodos de descalcificação comum.

Contu, Pirodda e Lipparini (29) observaram que a aplicação dos métodos de impregnação de prata na demonstração das terminações nervosas no órgão colear, dá resultados ótimos após o uso de descalcificação eletrolítica.

Kovacs (30) que inicialmente experimentou o método de Wilson na descalcificação dos dentes, sem conseguir boa demonstração histológica da polpa, utilizando o método da descalcificação eletrolítica com uma solução de ácido fórmico a 10% e ácido clorídrico a 8% e controlando a temperatura que não deve ser superior a 30°C, verificou com a aplicação dos métodos da hematoxilina-eosina, Mallory, método de Eros a fucsina ácida e método de impregnação de prata, que a conservação e a colorabilidade dos tecidos permite boas preparações em menos de 24 horas.

Lucas (31) confirmou os resultados de Lillie ou seja que o efeito descalcificante da eletrólise era consequência exclusivamente do aumento da temperatura.

Kovacs (32), aplicando com bons resultados, em dentes humanos descalcificados eletroliticamente, os métodos de impregnação de prata, de Bielschowsky-Gross, Cajal-De Castro, Bodian, Rio Hortega, Ruffini e Bielschowsky com modificações pessoais, observou nos canali-

culos da dentina fibrilas nervosas amielínicas que envolvem em forma de plexo os prolongamentos dos odontoblastos.

Contu e Montenegro (33), usando o método de descalcificação eletrolítica sugerida por Richman e col. com uma modificação casual, indicam terem conseguido uma boa eliminação do tecido ósseo sem comprometimento de estruturas delicadas, como os constituintes do tecido nervoso. Nesta observação, os autores relatam que, obtida a descalcificação, a peça óssea continuando no líquido descalcificante durante mais alguns dias, produz-se um entumescimento do tecido ósseo e a sua dissolução.

Freire de Barros (34), estudando a descalcificação do dente, faz uma comparação entre os vários processos de descalcificação, dedicando-se especialmente em verificar as vantagens qualitativas do método de descalcificação eletrolítica. Os métodos empregados foram os seguintes: solução de ácido nítrico a 2%, 6% e 10%; solução de ácido clorídrico a 2%, 6% e 10% e solução de ácido cítrico a 2%, 6% e 10% e descalcificação eletrolítica, usando soluções de ácido fórmico a 4% e ácido clorídrico a 5%. O autor conseguiu melhor resultado com a descalcificação eletrolítica, a qual forneceu ótima conservação das estruturas histológicas e grande afinidade para os corantes.

Contu e Montenegro (35) fizeram um estudo sobre a descalcificação eletrolítica em peças fixadas em substâncias diversas e com um controle rigoroso do pH e da temperatura. Os autores chegaram à conclusão de que a descalcificação eletrolítica, empregando-se uma solução de ácido clorídrico a 4% e ácido fórmico a 5%, com um controle do pH e da temperatura sobre ossos fixados em vários fixadores, não provoca nenhuma alteração na aplicação dos métodos de coloração comum; devendo, entretanto, a escolha do fixador estar relacionada com o método histológico a ser aplicado.

Freire de Barros (36), em um trabalho sobre o gânglio de Corti do feixe intraganglionar no qual usou os métodos de Schultze modificado por Saxem, Ramon e Cajal, Cajal-de Castro, Bodian segundo Leghissa (37), Bodian segundo Beccari (4), Bodian segundo Contu, Pirodda e Lipparini (29), Rio Hortega e

Bielchowsky segundo Montenegro (38), aconselha a descalcificação eletrolítica em banho constituído por 200 cc de uma solução de ácido clorídrico a 4% e ácido fórmico a 5% com contróle constante da temperatura que não deve passar dos 35°C. O tempo empregado para a descalcificação varia de 3-6 horas, evitando-se assim danos nas estruturas tissulares da peça por ser pequena a permanência na solução descalcificante.

Morris e Benton (39), estudando o processo de descalcificação eletrolítica, chegaram à conclusão que o único responsável pelo efeito descalcificante seria o aumento de temperatura, confirmando assim os resultados de Lillie e de Lucas.

Skaldin, Savtchenko e Popoff (40) descalcificaram com ótimos resultados fragmentos de ossos compactos em 42-72 horas e de ossos esponjosos em 6-12 horas, usando uma solução eletrolítica de ácido nítrico (150 ml), formaldeído (150 ml) e água destilada (700 ml).

Contu (41), estudando a inervação da cóclea, obteve bons resultados com a aplicação de métodos de impregnação de prata em temporais descalcificados eletroliticamente.

Contu (42), prosseguindo os estudos com uma solução de ácido clorídrico a 4% e ácido fórmico a 4%, insiste na necessidade do uso de material fixado e um contróle constante da temperatura durante a descalcificação, estabelecendo-a entre 25-30°C.

Contu (43), trabalhando em temporais de gato descalcificados eletroliticamente, verificou que os tecidos ósseos e cartilagosos, elementos neuro-epiteliais e elementos de sustentação, fibras nervosas mielínicas e amielínicas, aparecem especialmente em cortes tratados com a impregnação de prata, com imagens satisfatórias, constantemente superiores às correspondentes obtidas pelos métodos comuns de descalcificação.

Bifano (44) construiu um descalcificador no qual usava grande quantidade de líquido descalcificante (ácido clorídrico a 2% mais ácido fórmico a 8,2%) e a temperatura constante não superior a 25°C, com intensidade decorrente de 2 a 7 ampères e com inversão periódica da polaridade, permitindo assim a agitação contínua do líquido. Esta última

particularidade é também a base do processo de Thoma (45).

Thoma (45), baseado na hipótese de que um dos fatores importantes na aceleração da descalcificação consistia na agitação contínua do líquido, utilizou um agitador constituído por uma roda acionada pela água de uma torneira.

Celestino (46), empregou um aparelho de corrente contínua com possibilidade de variar a intensidade de 1 a 1000 mA e o potencial de 2 a 25 V, descalcificou eletroliticamente femur e rochedo do temporal de ratos fixados em formol salgada a 10%, calculando a velocidade de descalcificação com a perda de peso do osso. No seu trabalho, experimentando os líquidos usados por Richman e col., Ippolito, Bifano, como também soluções de ácido nítrico a 5%, ácido cítrico a 5%, citrato de amônio a 10%, citrato de sódio a 10%, citrato de potássio a 10%, ácido cítrico a 2%, mais citrato de amônio a 10%, ácido cítrico a 2% mais citrato de sódio a 10%, ácido cítrico a 2% mais citrato de potássio a 10%, concluiu que a eletrólise aquecendo, diluindo e agitando o líquido pode ser praticamente usada como meio indireto para acelerar a descalcificação.

Chaves (47 e 48), usando uma solução de ácido fórmico a 5% e ácido clorídrico a 4%, descalcificou eletroliticamente dentes permanentes hígidos, obtendo, com a aplicação da técnica de Bodian modificada, imagens dos canaliculos dentinários que permitiram ao autor suspeitar a possível existência de fibras e terminações nervosas.

Freire de Barros (49) utilizou a descalcificação eletrolítica no estudo do gânglio de Gasser de alguns vertebrados, aplicando sucessivamente com êxito os métodos de Cajal-De Castro, Ramon e Cajal, Bodian modificado e Ungewitter modificado.

Di Piramo (50) realizou a descalcificação eletrolítica de dentes fixados em formol a 10%, usando eletrodos de grafita e uma solução de ácido fórmico a 10% mais ácido clorídrico a 8%. Os dentes são colocados no anodo a temperatura constante e sem agitação. Foi determinada a percentagem e o tempo de descalcificação em função da densidade da corrente anódica e a esta acha-

se também condicionada a aceleração da descalcificação eletrolítica. Com o aumento da densidade da corrente foi obtido maiores concentrações de ácido fórmico na zona anódica, acelerando-se desta maneira o processo de descalcificação das peças.

Contu (51), depois de fixação intravital e descalcificação eletrolítica, usou com bons resultados em cócleas de gato os métodos de Cajal-De Castro e da hematoxilina férrica para estudar a morfologia das células nervosas no canal de Resenthal, nos canais descendentes do modíolo, na base do modíolo e no nervo acústico até o tronco comum.

Contu e Farias (52), estudando temporais humanos, de gato e de cobaios descalcificados eletroliticamente, observaram que a aplicação do método de Bodian modificado dava imagens de tecido ósseo superiores àquelas obtidas com outro tipo de descalcificação, evidenciando bem os osteócitos com seus prolongamentos anastomosados entre si, núcleos centrais e condriosomas granulares ou em forma de bastão nas células e nos seus prolongamentos.

Contu e Chaves (53) usaram com bons resultados, no estudo da fosfatase alcalina, a descalcificação eletrolítica em fragmentos de ossos de ratos fixados em acetona a frio e álcool a 80°. A descalcificação foi obtida em 1-2 horas na solução de 75cc de ácido clorídrico a 4% e 75cc de ácido fórmico a 5%.

Neves Pinto (54) insiste no uso da descalcificação eletrolítica no estudo da inervação da cóclea depois da fixação intravital. A aplicação dos métodos de Bodian modificado, Cajal-De Castro e hematoxilina férrica permitiu uma demonstração clara das fibras cocleares, aferentes e eferentes.

MATERIAL E MÉTODOS

Usamos sistematicamente cócleas de gato, cobaio e rato recém-nascidos, jovens e adultos; sendo nossa pesquisa orientada para ver os efeitos da descalcificação eletrolítica não só sobre o tecido ósseo como também sobre o tecido cartilaginoso, muscular, epitelial e nervoso, preocupando-nos os aspectos ligados à fixação e inclusão do material.

Utilizamos quase constantemente ossos de animais fixados em vivo; esta fixação apresenta a vantagem de permitir uma melhor aplicação dos métodos histológicos, como foi bem demonstrado em precedentes pesquisas (28, 29, 34, 35, 41, etc.).

Praticamente a fixação em vivo garante uma conservação ideal do material, o que não ocorre com a fixação post-mortem que geralmente compromete a peça durante a descalcificação.

Foi utilizada a descalcificação eletrolítica e como controle outras substâncias descalcificantes. Passamos, a seguir, à descrição dos diversos métodos.

DESCALCIFICAÇÃO ELETROLÍTICA

Foi usado um aparelho TUNGER, retificador de corrente contínua de 6-12 volts e de 4-4,5 ampères.

O método se baseia em determinar a ionização e a migração forçada do Ca, contido no tecido ósseo, sob a forma de fosfato triplo de carbonato ou de outros sais insolúveis.

A peça a descalcificar é ligada ao anodo, dentro do banho eletrolítico formado por 200 cc de uma solução de ácido clorídrico a 4% e ácido fórmico a 5%.

Controlamos constantemente a temperatura, para evitar a sua elevação além de 35°C, usando para isso pedaços de gelo ao lado do recipiente que contém a solução descalcificante. O pH 0,7 da solução foi controlado durante o processo e na realidade manteve-se uniforme.

O tempo empregado para a descalcificação foi aproximadamente de 3-9 horas.

Como controle usamos as soluções de ácido nítrico a 5% e ácido clorídrico a 5%, obtendo-se descalcificação em 12-20 dias. A descalcificação foi controlada, tanto na eletrolítica como nas demais, com uma reação de oxalato de amônio a 5% e hidróxido de amônio a 5%.

Excluindo-se os cortes em congelação, foi preferida a inclusão em celoidina-parafina com a seguinte técnica: 1.º) celoidina a 2% ... dois dias. 2.º) celoidina-benzoato de metila em partes iguais... três dias. 3.º) inclusão em parafina.

MÉTODOS HISTOLÓGICOS

Usamos os seguintes métodos histológicos:

- 1.º) método de hematoxilina férrica.
- 2.º) método de Lison-Dagnelie.
- 3.º) método de Bodian modificado.
- 4.º) método de Pearson O'Neil.
- 5.º) método de Cajal-De Castro.
- 6.º) método de Bielschowsky modificado.
- 7.º) método Bielschowsky-Hortega.
- 8.º) método de Mallory.

O método de hematoxilina férrica foi utilizado para o estudo do núcleo e citoplasma das células ósseas, cartilaginosa, nervosa, etc.; o método de Lison-Dagnelie para o estudo da bainha mielínica; o método de Bodian, para células e fibras nervosas; o método de Pearson O'Neil, para demonstração de células e fibras nervosas em material de recém-nascido; os métodos de Cajal-De Castro, Bielschowsky modificado e Bielschowsky-Hortega, para a demonstração de células e fibras nervosas, células neuroepiteliais, células de Schwann e anficitas; o método de Mallory, para visão de conjunto das peças.

MÉTODO DA HEMATOXILINA-FÉRRICA SEGUNDO MECCARI, (4)

- 1) Fixação intravital com o líquido de Bouin.
- 2) Descalcificação eletrolítica.
- 3) Refixação no Bouin.
- 4) Inclusão em celoidina-parafina.
- 5) Cortes seriados de 10 micra.
- 6) Desparafinação e passagem, por 24 horas, numa solução aquosa de alúmen férrico a 2,5%.
- 7) Lavagem rápida em água destilada.
- 8) Imersão, durante 16 horas, em hematoxilina de Heidenhein assim preparada: a frio, dissolve-se uma grama de hematoxilina em 10 cc de álcool a 90 graus e junta-se 90cc de água destilada. A solução permanece, durante dois meses, exposta à luz antes de ser utilizada.
- 10) Lavagem em água corrente por 2-3 horas.

- 11) Diferenciação no alúmen férrico a 2,5%, controlada ao microscópio.
- 12) Lavagem em água corrente por 1 hora.
- 13) Passagem em água destilada.
- 14) Desidratação na série ascendente dos álcoois.
- 15) Xilol e montagem em bálsamo do Canadá.

Este método nos forneceu imagens surpreendentemente boas das células ganglionares de Corti (fig. 1 A), fibras mielínicas (fig. B e C), células neuroepiteliais, ligamento espiral e estria vascular (fig. 2 A), como também do tecido ósseo, aparecendo bem visíveis os osteócitos (fig. 2 B).

Os corpos das células ganglionares apresentam-se nítidos, revelando núcleo e citoplasma; as fibras mielínicas aparecem bem, tanto em cortes longitudinais como transversais (fig. 1 B e C).

As fibras cocleares, com a possibilidade dos cortes seriados, podem ser observadas ao longo de sua distribuição; o que não foi conseguido com as fibras amielínicas no osso temporal (plexo carotídeo), nem com as fibras que passam pela foramina nervina por perderem a bainha mielínica.

MÉTODO DE LISON-DAGNELIE

- 1) Fixação em formol neutro a 10% durante 5 dias.
- 2) Descalcificação eletrolítica.
- 3) Lavagem em água corrente durante 24 horas.
- 4) Refixação em formol neutro durante 1 dia.
- 5) Cortes por congelação com 15-20 micra.
- 6) Corar 12 a 15 horas em solução saturada de negro Sudan em álcool a 70°, filtrado antes do uso.
- 7) Lavagem em água destilada e montagem em xarope de Apathy.

Impróprio para o estudo do tecido ósseo, cartilaginoso, conjuntivo e neuroepitélio, é um ótimo método para demonstrar a bainha mielínica, razão pela qual evidencia com muita nitidez as fibras cocleares mielínicas (fig. 3 A, B e C).

MÉTODO DE BODIAN MODIFICADO POR CONTU, PIRODA E LIPPARINI (29)

- 1) Fixação em: formol 5 cc, ácido acético 5 cc e álcool 95° 90 cc. Outros fixadores bons são o De Castro e o Rio Hortega.
- 2) Descalcificação eletrolítica e posterior fixação por 24 horas.
- 3) Inclusão em celoidina, secção de 12 a 15 micra, e colocação dos cortes em água destilada.
- 4) Deixar os cortes, por 12 a 48 horas, ao frio e no escuro, em protargol a 1%. Em 100 cc de protargol a 1% se adicionam 4 a 6 gr de cobre eletrolítico. A solução de protargol é usada uma só vez.
- 5) Agitar em água destilada e reduzir por 10 minutos, em: água destilada 100 cc, hidroquinona 1 gr e sulfito de sódio 5 gr.
- 6) Em vez de sulfito de sódio, pode-se usar 5 cc de formol.
- 7) Lavagem em água destilada, por 1 hora e viragem em cloreto de ouro a 1%. Em 100 cc da sol. de cloreto de ouro a 1%, adicionam-se 3 gotas de ácido acético.
- 8) Lavagem em água destilada e passagem, por 12 a 15 minutos, em uma solução de ácido oxálico a 1%, até que se obtenha uma cor violeta.
- 9) Lavagem em água destilada e fixação em hipossulfito de sódio a 5%, durante 2 a 5 minutos.
- 10) Lavagem em água destilada, desidratação e montagem com Bálsamo. Pode-se dar uma coloração de contraste com acridina vermelha a 1%, durante 1 minuto, ou corar com o método de Mallory.

Para a solução de protargol, usa-se água destilada tamponada, ao pH de 3.8 com o seguinte método: à 17 cc de ácido acético a 5/M, adicionam-se 3 cc de Na C₂H₃O₂ a 5/M. A 1 litro de água destilada juntam-se 14 cc deste tampão.

Este método, aplicado quase somente para estudo do tecido nervoso (fig. 4 A), mostrou-se eficaz para o tecido ósseo e cartilaginoso. Os osteócitos apresentam claramente os seus prolongamentos ramificados e anastomosados entre si, os núcleos no centro do corpo celular e

os condriosomas em toda a extensão do citoplasma (fig. 4 B e C).

Seja em relação ao tecido nervoso, epitelial ósseo e cartilaginoso podemos observar as vantagens da descalcificação eletrolítica quando utilizamos esta técnica; pois, os resultados obtidos com material de controle são bastante inferiores.

MÉTODO DE PEARSON E O'NEIL

- 1) Fixação em: formol a 10%; álcool-formol acético ou líquido de Bouin.
- 2) Descalcificação eletrolítica e posterior fixação durante 24 horas.
- 3) Inclusão em celoidina, secção de 12-15 micra.
- 4) Lavagem em água destilada.
- 5) Nitrato de Prata a 2% em estufa a 60°.
- 6) Passagem na seguinte solução:
Hidroquinona
Nitrato de Prata
Gelatina
em estufa a 60° até a solução ao alcançar cor marron dourada.
- 7) Lavagem em água tamponada a pH 4,4 (um litro de água destilada mais 15 gotas de ácido cítrico a 1%).
- 8) Lavagem em água destilada e desidratação e montagem em bálsamo do Canadá.

Com este método próprio para material fetal e de recém nascido, evidenciamos muito bem certos constituintes da cóclea, como as células ganglionares de Corti, fibras mielínicas, fibras amielínicas, células ósseas e cartilaginosas.

Aparecem de modo especial o núcleo e nucleólo das células ganglionares, os anficitas em sua posição pericelulas (fig. 5A), os osteócitos com seus prolongamentos anastomosados entre si (fig. 5B e C); embora para estes últimos elementos os resultados são inferiores aos apresentados pelo método de Bodian.

MÉTODO DE CAJAL-DE CASTRO

- 1) Fixação intra-vital, com fixador de Castro (hidrato de cloralio 9 gr., álcool a 95° 150 cc, água destilada 10 cc, ácido nítrico 3 cc).
- 2) Descalcificação eletrolítica.
- 3) Fixação, com fixador de Cajal-De Castro, por 12 horas (no lugar do

- ácido nítrico, foi adicionado, à solução, Sonifen Roche 1 cc).
- 4) Lavagem, em água corrente, por 15 horas.
 - 5) Lavagem, em água destilada, por 1 hora.
 - 6) Enxugar com papel filtro e passar, por doze horas, em: álcool absoluto puro para análise ao qual junta-se duas gotas de amoníaco puríssimo Merck.
 - 7) Imersão, por dez minutos, em água destilada.
 - 8) Passagem, em recipiente escuro, numa solução de nitrato de prata a 1,8% a temperatura de 38°, por 5 a 6 dias.
 - 9) Lavagem, por vários minutos, em água destilada.
 - 10) Redução em uma solução, preparada no momento do uso, contendo: ácido pirogálico cristalizado Merck 1 gr., formalina Schering 6 cc, água destilada 94 cc, por 24 horas.
 - 11) Lavagem em água destilada.
 - 12) Série ascendente dos álcoois.
 - 13) Inclusão em celoidina e celoidina-parafina.
 - 14) Secção em micrótomo, de 15 a 20 micra.
 - 15) Xilol e montagem.

Consideramos o método de Cajal-De Castro verdadeiramente notável; pois, além de permitir cortes seriados, forneceu-nos as melhores imagens de células e fibras nervosas mielínicas (fig. 7A), neuro-epitélio (fig. 8), fibras amielínicas (fig. 7C), membrana tectória, membrana basilar, membrana de Reisner (fig. 7B), ligamento espiral, estria vascular (fig. 6B), tecido ósseo e tecido cartilaginoso (fig. 6A).

MÉTODO DE BIELSCHOWSKY MODIFICADO

- 1) Fixação por mais de um mês em formol a 15-20%.
- 2) Corte por congelação e lavagem em água corrente.
- 3) Passagem dos cortes, por meio de agulhas de vidro, em piridina pura por 4-5 horas.
- 4) Cuidadosa lavagem em água destilada por longo tempo.
- 5) Passagem em nitrato de prata a

20% por uma hora em recipiente escuro.

- 6) Passagem em formol a 20%.
- 7) Passagem na solução de prata amoniacal preparada da seguinte maneira: algumas gotas de NH₃ são adicionadas a poucos cc de AgNO₃ até que o Ag seja todo dissolvido; coloca-se a solução em vidro de relógio e controla-se a coloração ao microscópio, suspendendo-a quando principia a corar o conetivo. Coloca-se então os cortes em água amoniacal (duas gotas de NH₃ mais 8 gotas de água).
- 8) Lavagem cuidadosa e viragem em cloreto de ouro a 1%.
- 9) Montagem em Bálsamo do Canadá.

Com este método conseguimos ótimas imagens de tecido nervoso. As células nervosas, os anficitas do gânglio de Corti (fig. 9 A), o neuro-epitélio (fig. 10 A) e as fibras mielínicas (fig. 9 B) aparecem bem evidenciadas; como também as células cartilagineas (fig. 9 C), os osteócitos (fig. 10 C), o ligamento espiral (fig. 10 B), a membrana de Reisner e a tectória.

MÉTODO DE BIELSCHOWSKY — HORTEGA SEGUNDO MONTENEGRO

- 1) Fixação em formalina a 10% ou em líquido fixador de Hortega, no mínimo por 10 dias.
- 2) Descalcificação eletrolítica.
- 3) Cortes por congelação de 15 a 25 micra.
- 4) Refixação.
- 5) Lavagem, por 1 a 1½ hora, em água destilada, renovando-a três vezes.
- 6) Passagem em solução de nitrato de prata a 10%, por várias horas.
- 7) Passagem rápida em solução aquosa de Piridina (duas gotas em 30 a 40 cc de água).
- 8) Passagem na solução di-amino de Rio Hortega (uma hora e meia, a frio, e 15 a 20 minutos a quente).
- 9) Lavagem rápida em água destilada.
- 10) Passagem em solução de formol a 2%.
- 11) Lavagem em água destilada.
- 12) Viragem em cloreto de ouro a 5%.
- 13) Lavagem em água destilada.

- 14) Fixação em hipossulfito de sódio a 5%.
- 15) Lavagem em água destilada.
- 16) Desidratação e montagem em balsamo.

Empregamos este método com a finalidade precípua de estudar os anfiцитas, células do gânglio de Corti (fig. 11 B) e células de Schwann; entretanto, deu bons resultados na demonstração das fibras nervosas (fig. 11 A), tecido ósseo (fig. 12 C), tecido cartilaginoso (fig. 12 D) e elementos neuro-epiteliais do órgão de Corti (fig. 12 A) e ligamento de Reissner (fig. 12 B).

MÉTODOS DE MALLORY

- 1) Fixação em formol a 10% e inclusão em celoidina.
- 2) Cortes em congelação.
- 3) Passagem por 5 minutos em solução aquosa de fucsina ácida a 0,5%.
- 4) Passar diretamente para uma solução de: azul de anilina solúvel em água 0,5 gr, laranja G 2,0 gr e solução a 1% de ácido fosfo-molibdico 100 ml.
Deixar nesta solução por 10 a 20 minutos.
- 5) Lavar e desidratar em álcool a 95, trocando-o várias vezes.
- 6) Montagem.

CONSIDERAÇÕES E CONCLUSÕES

Após demorados e sucessivos estudos dos constituintes da cóclea com a descalcificação eletrolítica, apresentamos os resultados obtidos não com finalidade polémica a respeito do mecanismo da eletrólise e nem sobre os aspectos que o fazem considerar um método indireto, cuja única consequência seria a aceleração da descalcificação por meio do aquecimento, diluição e agitação, como sustentam Lillie e colaboradores.

Parece-nos exagerada a conclusão de alguns autores, como Celestino, que afirmam ser o processo da descalcificação eletrolítica, na observação do osso temporal, totalmente destituída de utilidade prática; considerando que neste tipo de pesquisa interessa não somente o tecido ós-

seo e cartilaginoso, mas também as delicadas estruturas nervosas, neuro-epiteliais, etc. . .

Visto serem as experiências sobre a cóclea executadas preferentemente em gato ou cobaio empregamos a fixação "in vivo", devido à grande dificuldade de penetração dos fixadores pelos processos comuns.

Julgamos a fixação intravital ponto essencial, pois o uso da descalcificação eletrolítica fornece bons resultados em tecidos rigorosamente fixados.

Estes tecidos permanecendo na eletrólise poucas horas em contato com os líquidos descalcificantes, apresentam-se em muito melhores condições para a aplicação dos métodos histológicos do que se aplicássemos métodos ordinários de descalcificação. Isto reveste-se de mais valor quando empregamos os métodos especiais de impregnação de prata e os histoquímicos.

Lógicamente ainda em relação à aplicação de técnicas histológicas no osso temporal são indispensáveis outras precauções, com as ligadas aos processos de inclusão e corte; devemos eliminar a inclusão em parafina, optando pela dupla inclusão em celoidina-parafina por ser de rápida execução, muito embora o método da inclusão em celoidina seja melhor, porém muito lento.

Desejamos também lembrar outro detalhe de ordem técnica com referência ao método da descalcificação, como o controle da temperatura que não deve ultrapassar de 35°C, o que obtemos colocando pedaços de gelo numa cuba de paredes duplas durante o processo de descalcificação.

Os nossos resultados, extremamente interessantes, contrariam a opinião de que o processo de descalcificação eletrolítica não possui utilidade prática, principalmente se observarmos os dados obtidos com os métodos de hematoxilina-férrica, Lison-Dagnelie, Bodian modificado, Pearson O'Neil, Cajal-De Castro, Bielschowsky-Hortega e Mallory, conforme documentação fotográfica.

O uso destes diversos métodos histológicos, específicos para determinados tecidos, deu resultados muito satisfatórios quando empregada a descalcificação eletrolítica precedida de fixação intravital

e em seguida realizada a inclusão em celoidina-parafina.

SUMÁRIO

Os autores, estudando cóclea de gato após descalcificação eletrolítica, precedida de fixação intravital e seguida de inclusão em celoidina-parafina, obtiveram resultados muito satisfatórios na observação do órgão de Corti com o emprêgo dos métodos de hematoxilina férrica, Lison-Dagnelie, Bodian modificado, Pearson O'Neil, Cajal-De Castro, Bielschowsky modificado, Bielschowsky-Sortega e Mallory.

SUMMARY

The authors, studying cochleas of cats after electrolytic decalcification, had satisfactory results in Cort's organ studies, using the Ferric hematoxiline's, Lison-Dagnelie's, Bodian's (modified), Pearson-O'Neil's, Cajal-De Castro's, Bielschowsky's (modified), Bielschowsky-Hortega's (modified) and Mallory's methods.

BIBLIOGRAFIA

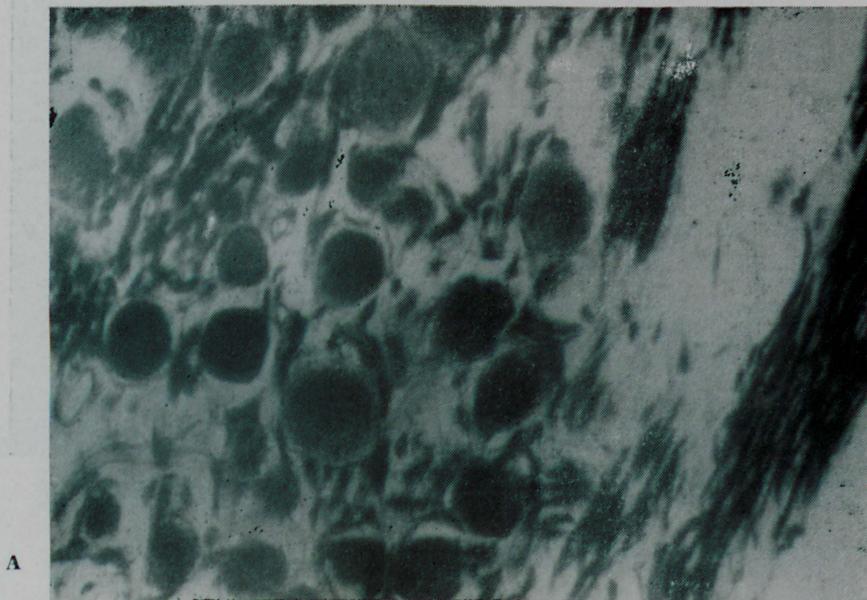
- 1) Romeis B. — Técnica histológica, 370-375. Editorial Labor S.A., Barcelona, 1928.
- 2) da Costa C. e Chaves P. R. — Manual de técnica histológica, 150-151, 392. Portugalia Ed. Lisboa, 1943
- 3) Fernandes M. C. — Métodos escolhidos de técnica microscópica, 141-144. Imprensa Nacional, Rio de Janeiro, 1943.
- 4) Beccari N. — Elementi di técnica microscopica, 271-273, Societa Editrice Libreria, Milano, 1946.
- 5) Gomori G. — Microscopic Histochemistry, 179, The university Chicago. Press, 1952.
- 6) Lison L. — Histochemie et cytochemie animales, 164, Gauthier-Villars Editeur, Paris, 1953.
- 7) Lillie R. D. — Histopathologic technic and practical histochemistry, Ed. Blakiston, New York, 1953.
- 8) Montaldo G. Manuale di técnica istopatológica, 119-127, Minerva Medica, Torino, 1959.
- 9) Pearse E. — Histochemistry theoretical and applied, Ed. Churchill, London, 1960.
- 10) Romeis B. — Taschenbuch der Mikroskopische Technik. Ed. Oldenburg, München, 1954.
- 11) Clapp M. P. — A rapid method for the decalcification of bone, Am. Jour. of Med. Tech., vol. 1, 31-32, 1935.
- 12) De Galanta, E. J. — Am. Jour. Tech. Meth. vol. 17, 72, 1937.
- 13) Kramer e Shipley R. — Decalcification of bone in acid free solution, Science 64, 484-485, 1927.
- 14) Jaffé H. L. — Methods for the histologic study of normal and diseased bone, Arch. Path. 8, 817, 1929.
- 15) Evans N. e Karajan, A. — Laboratory methods and technical notes; new methods of decalcification arch path. vol. 10, 1930 (fotocópia).
- 16) Mac Nmara W. L. — Method of simultaneous fixations and decalcification of bone, Jour. Lab. Clin. Med. 25, 847-875, 1940.
- 17) Wilson G. H. — Rapid decalcification with nitric acid, Jour. Path. and bacter. vol. 39, 531-533, 1934.
- 18) Powers M. M. — The staining of nerve fibers in teetch, J. D. Res. 31, 383-392, 1952.
- 19) Ebling H. — Inervação do periodonto do incisivo inferior do rato, tese, Pôrto Alegre, 1957.
- 20) Louro Marques L. — Inervação da polpa dentária e da dentina, tese, Pôrto Alegre, 1958.
- 21) Dotti L. B., C. P. Paparo e B. E. Clarke — The use of ion exchange resin in decalcification of bone, Am. J. Clin. Path. 21, 475-479, 1951.
- 22) Rasmussen G. L. — A method of staining the statoacoustic nerve in bulk with Sudan Black B., The anat. record 139, 465, 1961.
- 23) Ichmit, R. W. — Simultaneous fixation and descaclification of tissue. Lab. Invest. 5, 306-307, 1956.
- 24) Richman, I. M., Gelfand, M., e Hill, J. M. — Laboratory methods and tecnica 1 notes a method of decalcifying bone for histologic section. Arch of Path., 44-92, 1947.
- 25) Ippolito, G. — Utile modificazione al metodo elettrolitico di descalci-

- ficazione delle ossa. Ateneo Parmense, 19, 44-47, 1948.
- 26) 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, 711-722, 1951.
- 27) Merlo, G. — Studio chimico e morfologico dell'ossa mediante elettrolise. — Biol. Latina, 5, 260-266, 1952.
- 28) Contu, P. e Pirodda, E. — 11 procedimento di descalcificazione elettrolitica nel l'indagine istologica del temorale. Oto-Rino Laringologia Italiana, vol. XXI, fasc. I, 42-47, 1952.
- 29) Contu, P., Pirodda, E. e Liparrini, R. — Procedimenti tecnici di impregnazione argéntica delle terminazioni nervose dell'organo cocleare. Monit. Zool. Ital. vol. LP, 1-12, 1952.
- 30) Kovacs, G. — Sulla descalcificazione elettrolitica nella indagine istologia del dente. Clinica Odontoiatrica n.º 6, 1-3 (separata) 1952.
- 31) Lucas R. B. — Observation on the electrolysis method of descalcification. J. Path. Bact. 64, 654-657, 1952.
- 32) Kovacs, G. — Osservazioni sull'innervazione della dentina. Clinica odontoiatrica anno VIII, n.º 11, 1-3 (de separata) 1953.
- 33) Contu, P. e Montenegro, D. — Sôbre uma modalidade técnica para a demonstração macroscópica das constituintes nervosas do caracol. Anais da Fac. de Med. da Univ. do Recife vol. 15, 177-180, 1955.
- 35) Contu, P. e Montenegro, D. — Descalcificação elettrolítica de ossos fixados em vários fixadores. — Fac. de Med. da Univ. do Recife. vol. 15, n.º 2, 163-167, 1955.
- 36) Freire de Barros, H. — Avaliação comparativa de vários métodos de impregnação de prata para o estudo das células do ganglio de Corti e do feixe intraganglionar. — Tese — Recife — 1955.
- 37) Lighissa, S. — Metodi Standard di colorazione del tessuto nervoso. S. A. S., n.º 20-20, 35-63, 1950.
- 38) Barbosa da Costa, A., Bancowsky, I e Montenegro, D. — Processo técnico de impregnação argéntica da cápsula pericelular, dos gânglios simpáticos. Neurobiologia, Tomo XVIII, n.º 129-134, 1955.
- 39) Morris, R. E., Benton, R. S. — Studies on demineralizations of bone. The basic factors of demineralization. The effect of electrolytic technics in demineralization.
- 40) Skaldin, P. V., Savtchenko, E. D., e Popoff, M. R. — Resum em Excerpta Médica, Sector I, 1957.
- 41) Contu, P. — Observations and considerations about the cochlear innervation of the cat. The Laringoscope. vol. LXIII, n.º 3, 586-596, 1958.
- 42) Contu, P. — Considerações sôbre a descalcificação elettrolítica. Arq. Inst. Anat. de Pôrto Alegre, vol. III, 67-69, 1959.
- 43) Contu, P. — Observações histológicas sôbre o tecido ósseo, cartilaginoso e nervoso, após a descalcificação elettrolítica. Arq. Inst. Anat. de Pôrto Alegre, vol. III, 71-72, 1959.
- 44) Bifano, U. — Sulla descalcificazione elettrolitica in odontomatologia. Riviste ital. di Stomatologia 2, 152-155, 1960.
- 45) Thoma — citado por Schmorl — Imetodi della indagine histopatologica. Ed. Utet. Torino, 1930.
- 46) Celestino, D. — Studio critico dell'impiego della descalcificazione elettrolitica nell'istologia del temporale. II Valsalva, vol. XXXVI, 209-215, 1960.
- 47) Chaves, J. M. — Observações e considerações técnicas sôbre a inervação da dentina. Arq. Inst. Anat. vol. V, 99-104, 1963.
- 48) Chaves, J. M. — Observation about structure of the dentin. Anatomical Record. vol. 15, 313, 1963.
- 49) Freire de Barros, H. — O gânglio de Gasser na série vertebrata. Odonto - Estomatologia. Vol. III, 1-66, 1.962.
- 50) Di Piramo, S. — Contribucion al estudio de la descalcificacion elettroquímica de tecidos calcificados Aplicacion e le descalcificacion dentaria — Anales de la Facultad de Odontologia n.º 10, 5-16, 1.961-62.
- 51) Contu, P. — Sôbre a topografia das

- células do gânglio de Corti: Pesquisas anatômicas — no modíolo e no tronco coclear do nervo acústico. Anais da Fac. de Med. de Pôrto Alegre, ano 21, 39-56, 1.961.
- 52) Contu, P. e Farias, A. — Observações histológicas sôbre o tecido ósseo tratado com o método de Bodian depois da descalcificação eletroíltica. Anais da Fac. de Medicina de Pôrto Alegre, ano 22, 81-85 — 1.962.
- 53) Contu, P. e Chaves, J. M. — Application of histochemical methods for alkaline phosphatase in bone after electrolytic descalcification Anatomical — Record, vol. 148, n.º 2, 365, 1.964.
- 54) Neves Pinto, R. M. — Contribuição ao estudo da inervação da cóclea Tese — Pôrto Alegre, 1.964.

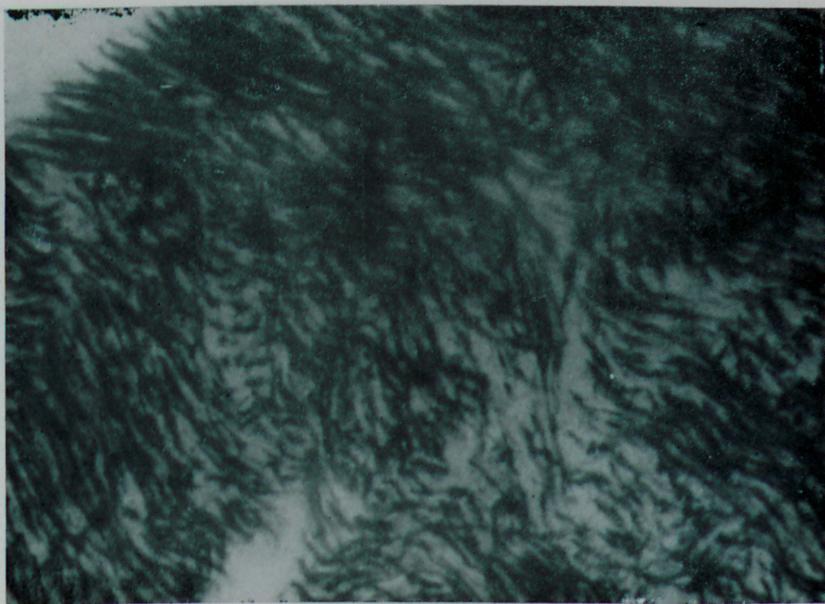
FIG. N.º 1

Gato adulto: secção longitudinal da cóclea.



A

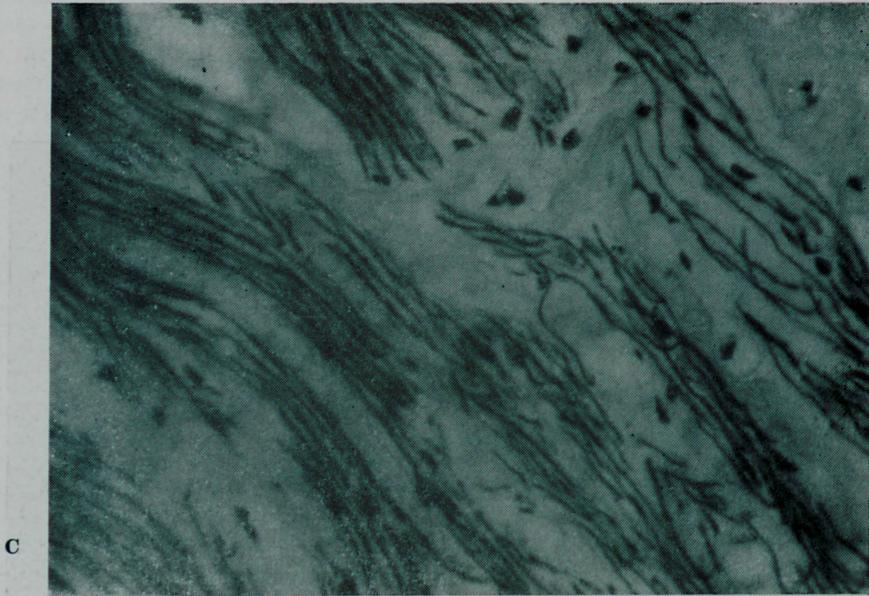
Em A — Gânglio de Corti.



B

Em B — Visão transversal do nervo coclear.

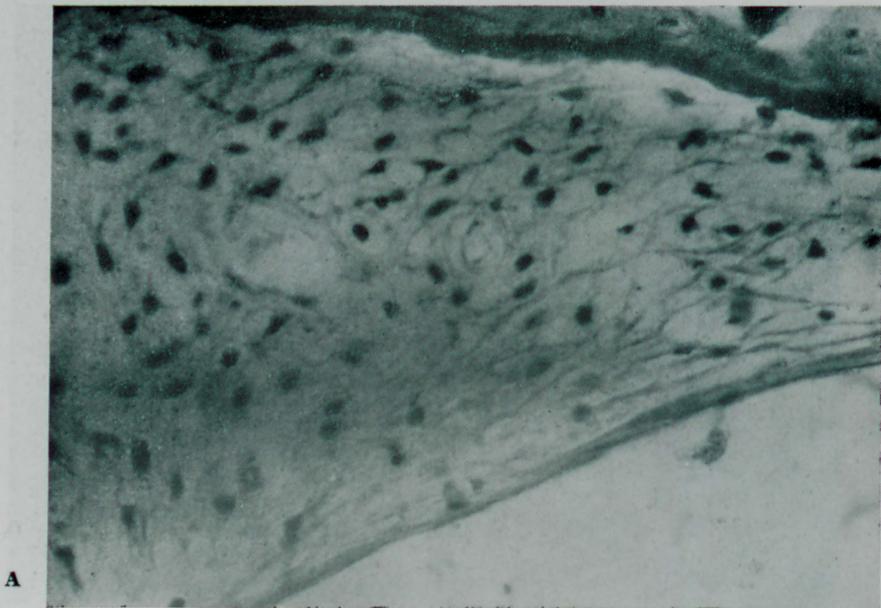
FIG. N.º 1



Em C — Visão longitudinal das fibras do nervo coclear,
nos canais descendentes do modíolo.
Aumento 45 x
Método da hematoxilina férrica.

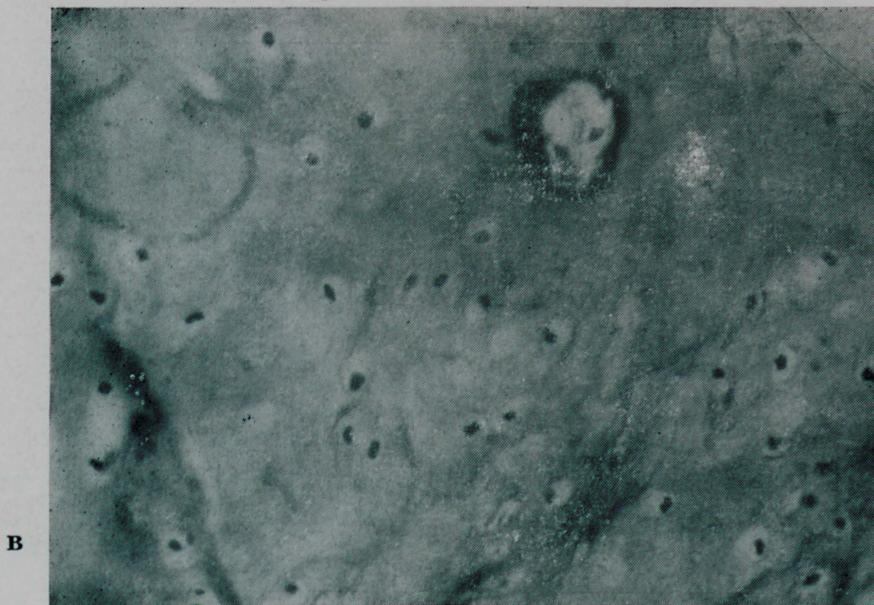
FIG. N.º 2

Gato adulto: secção longitudinal da cóclea.



Em A — Ligamento espiral e estria vascular.

FIG. N.º 2

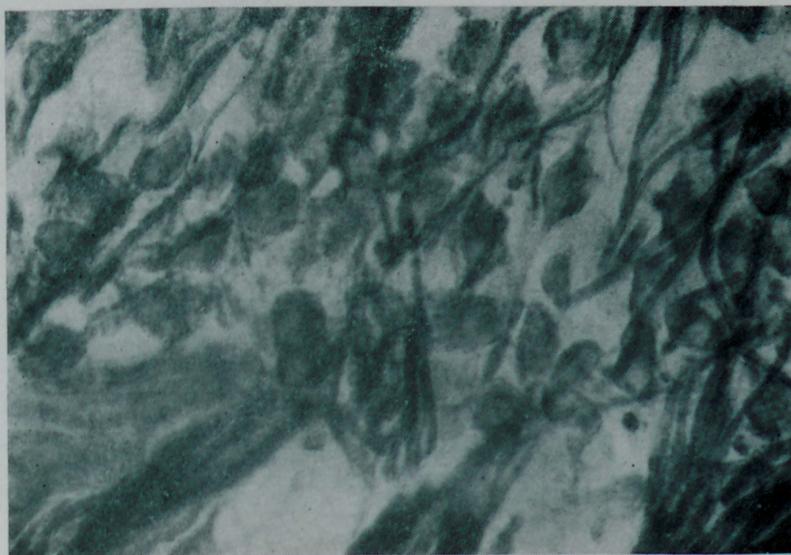


B

Em B — Tecido ósseo da cóclea.
Aumento 45 x
Método da hematoxilina férrica.

FIG. N.º 3

Gato adulto: secção longitudinal da cóclea.

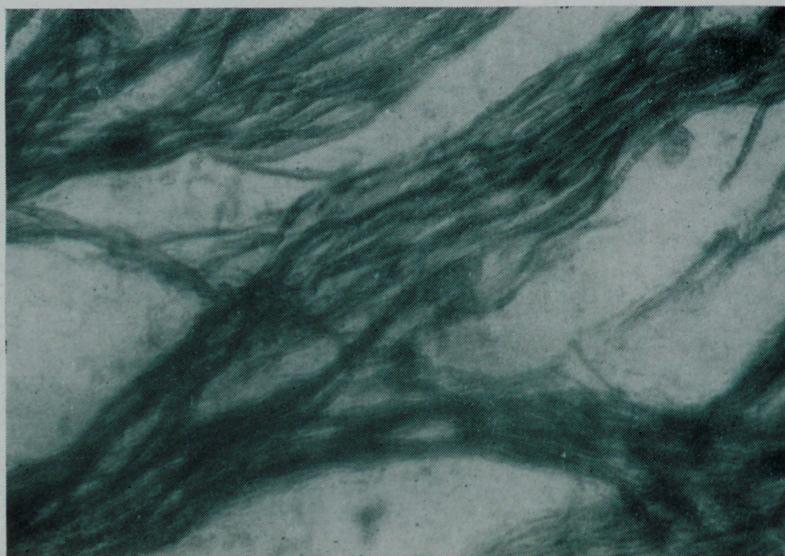


A

Em A — Células e fibras nervosas do Gânglio de Corti.

FIG. N.º 3

B



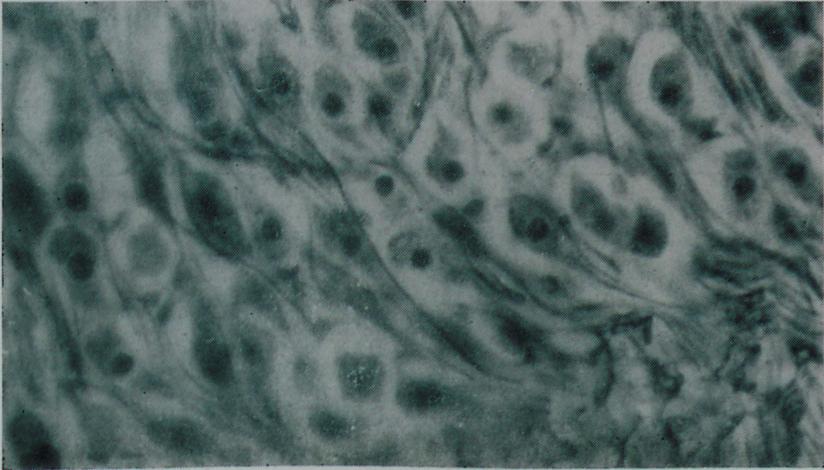
C



Em B e C — Fibras da lâmina espiral.
Aumento 45 x
Método de Lison-Dagnelie.

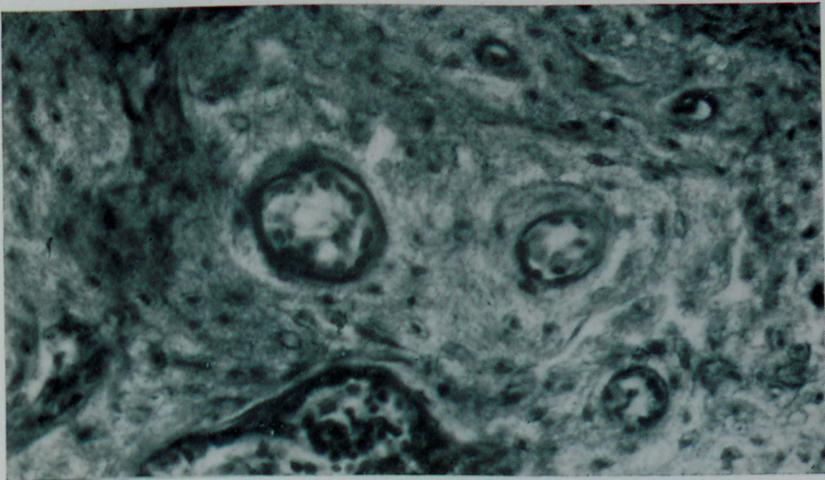
FIG N.º 4

Gato adulto: secção longitudinal da cóclea.



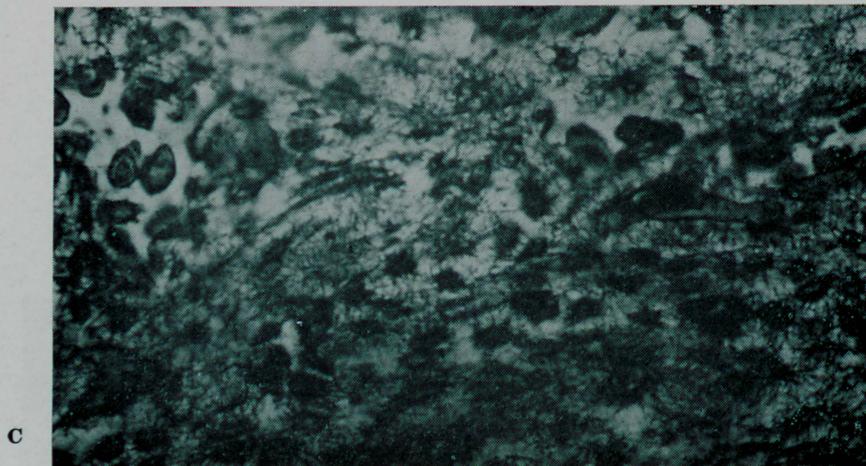
A

Em A — Células e fibras nervosas do gânglio de Corti.



B

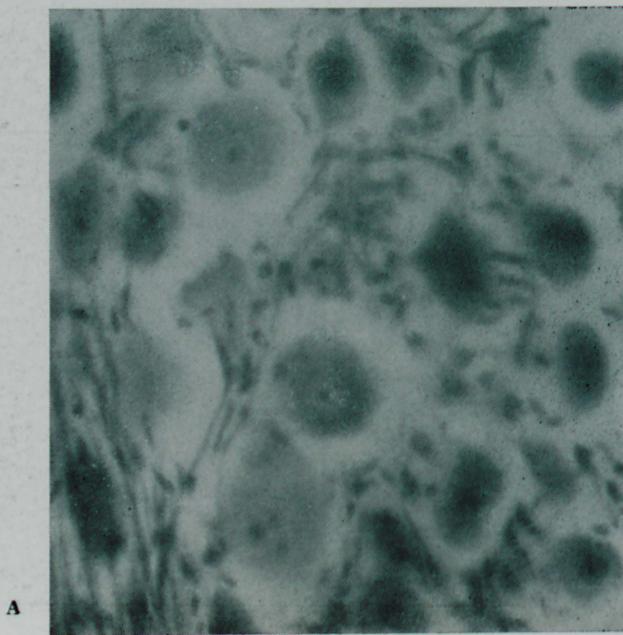
FIG. N.º 4



Em B e C — Tecido ósseo da cóclea.
Aumento 45 x
Método de Bodian modificado.

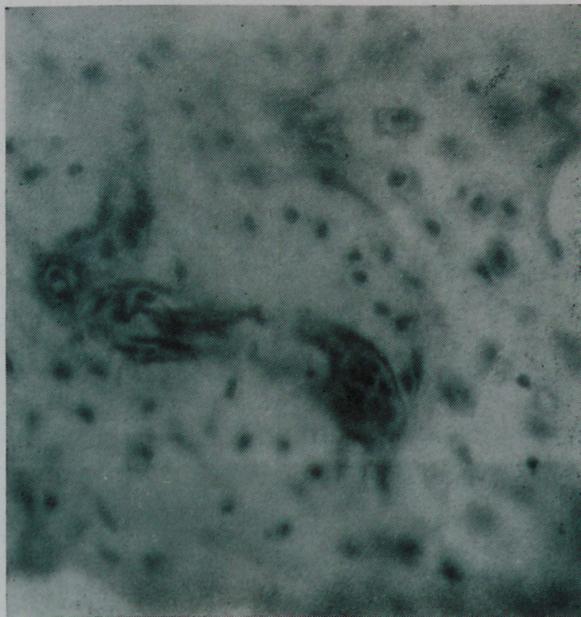
FIG. N.º 5

Gato recém-nascido: secção longitudinal da cóclea.

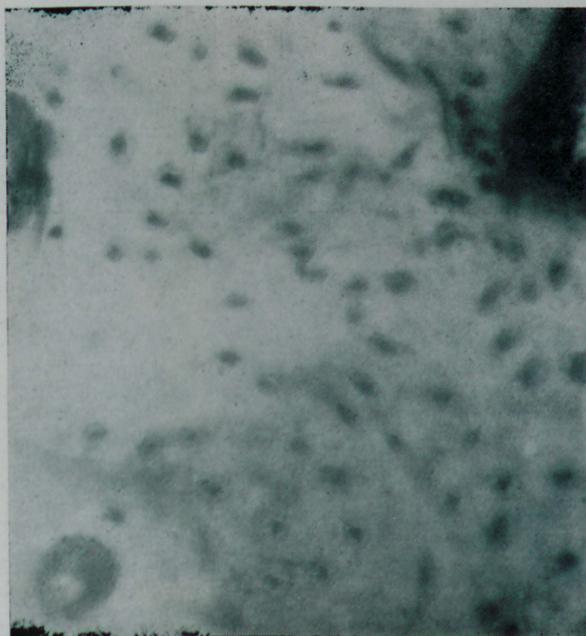


Em A — Células, anfiblastas e fibras do gânglio de Corti.

FIG N.º 5



B

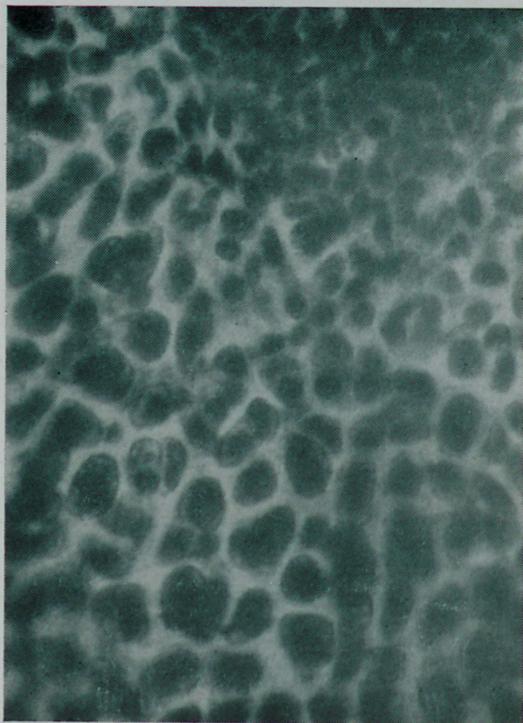


C

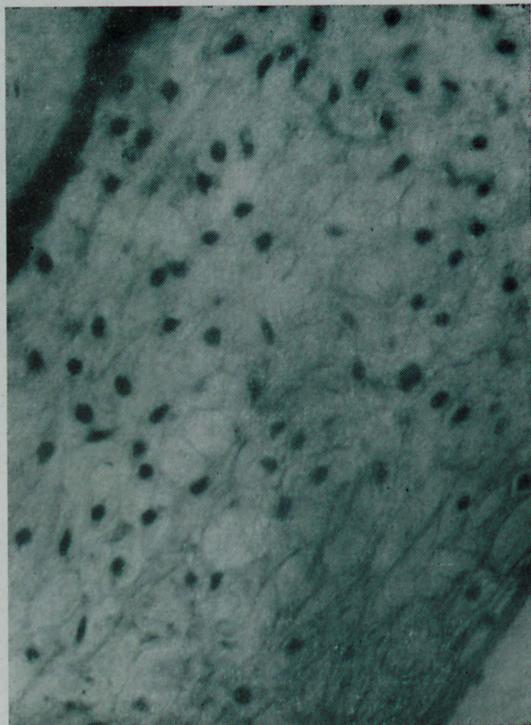
Em B e C — Tecido ósseo.
Aumento 45 x
Método de Pearson O'Neil.

FIG. N.º 6

Gato adulto: secção longitudinal da cóclea.



A

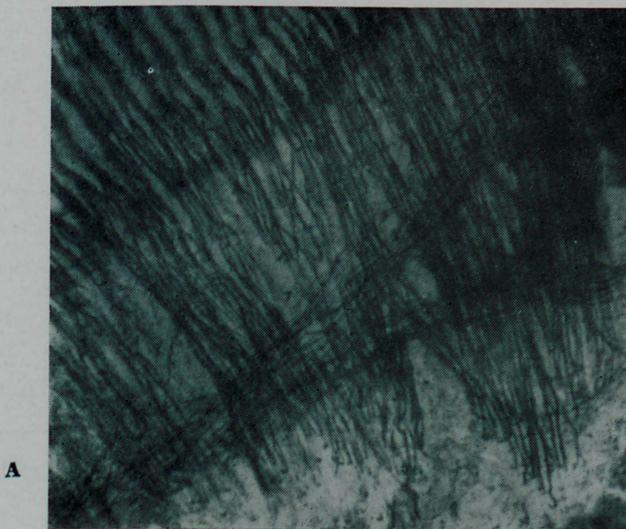


B

Em A — Células cartilagosas da tuba auditiva.
Em B — Ligamento espiral e estria vascular.
Aumento 45 x
Método de Cajal-De Castro.

FIG. N.º 7

Gato adulto: secção longitudinal da cóclea.



A

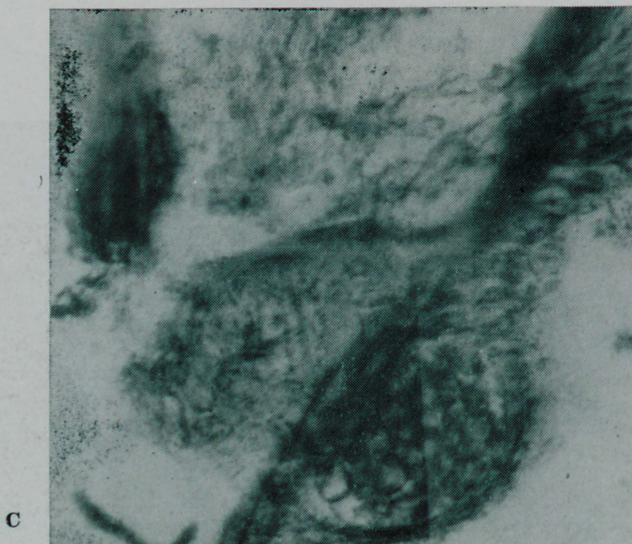
Em A — Fibras espirais e radiais da lâmina espiral.
Aumento 45 x



B

Em B — Membranas tectória, basilar e de Reisner e
ducto coclear.
Aumento 5 x

FIG. N.º 7



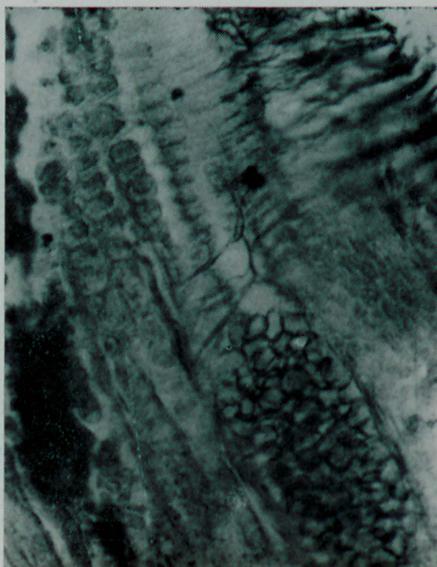
Em C — Mesma figura de B.
Aumento 45 x
Método de Cajal-De Castro.

FIG. N.º 8

Gato adulto: secção longitudinal da cóclea.



A

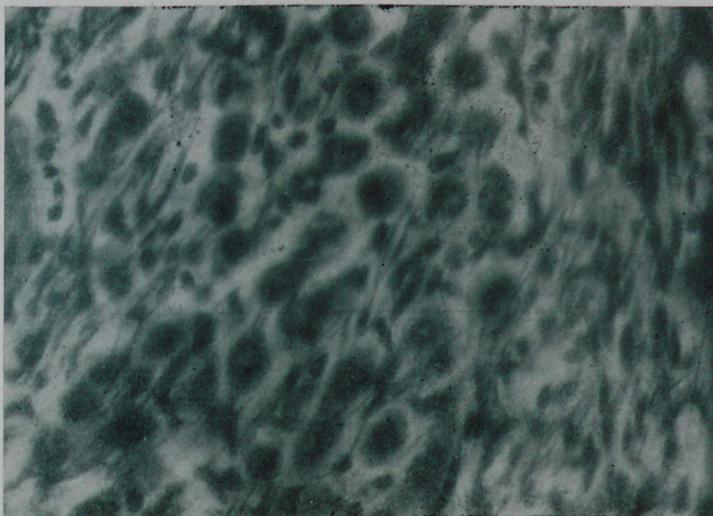


B

Em A e B — Células acústicas internas e externas, em
visão transversal.
Aumento 45 x
Método de Cajal-De Castro.

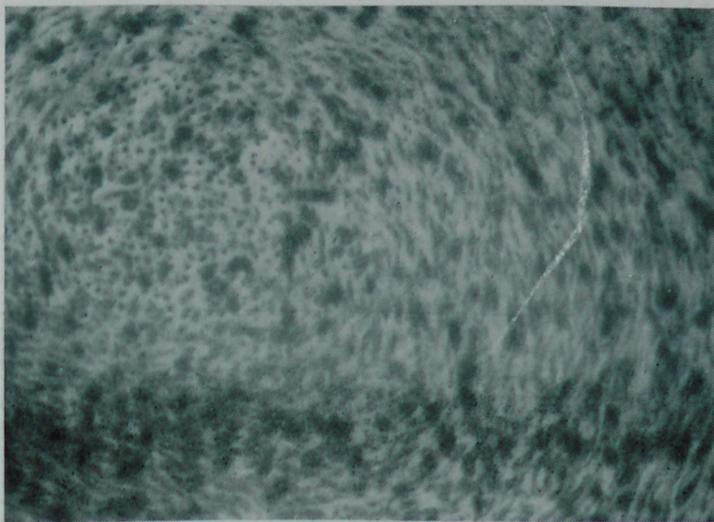
FIG. N.º 9

Gato adulto: secção longitudinal da cóclea.



A

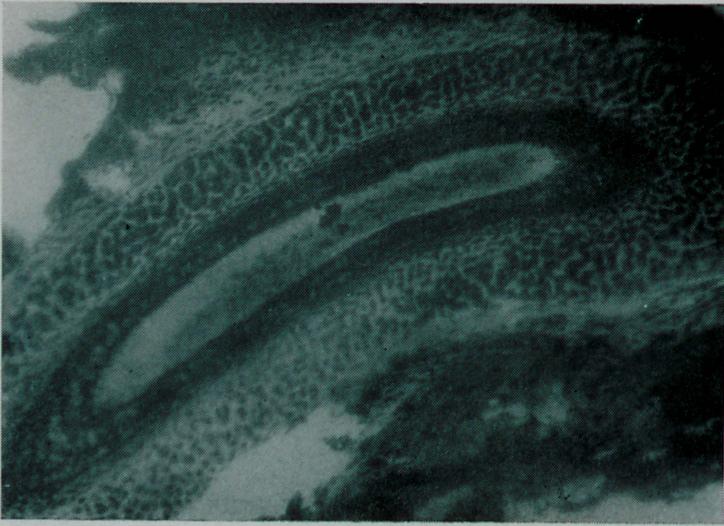
Em A — Células e anficitas do gânglio de Corti.



B

Em B — Fibras do nervo coclear em secção transversal.

FIG. N.º 9

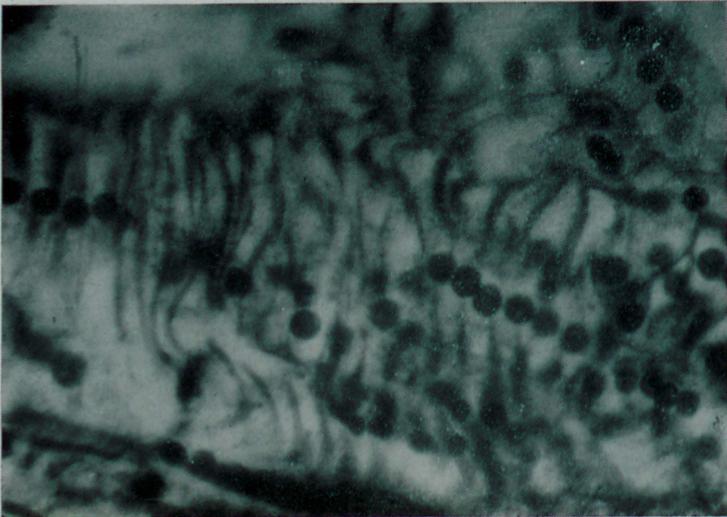


C

Em C — Secção transversal da tuba auditiva cartilaginosa.
Aumento 45 x
Método de Bielschowsky modificado.

FIG. N.º 10

Gato adulto: secção longitudinal da cóclea.

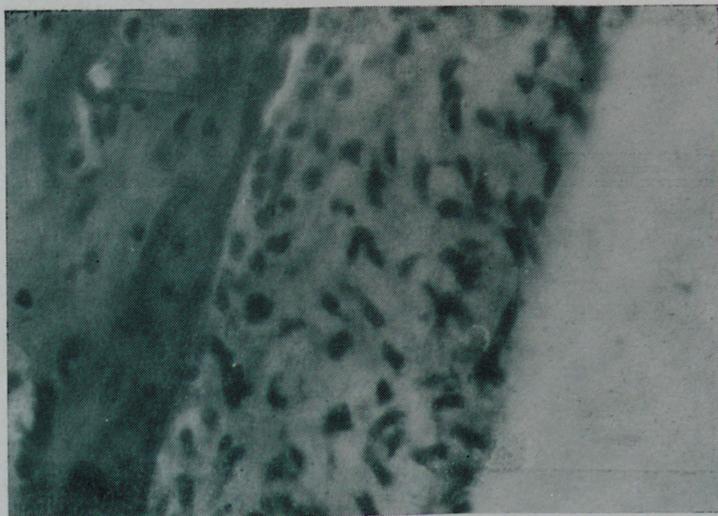


A

Em A — Neuroepitélio do órgão de Corti.

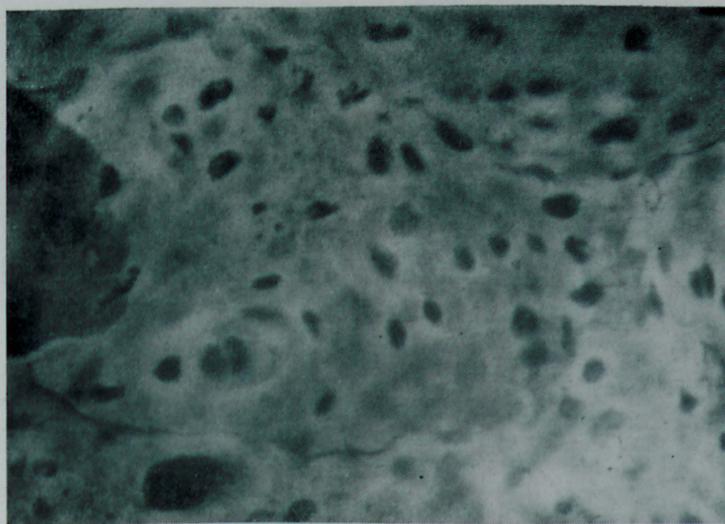
Fig. N° 10

B



Em B — Ligamento espiral.

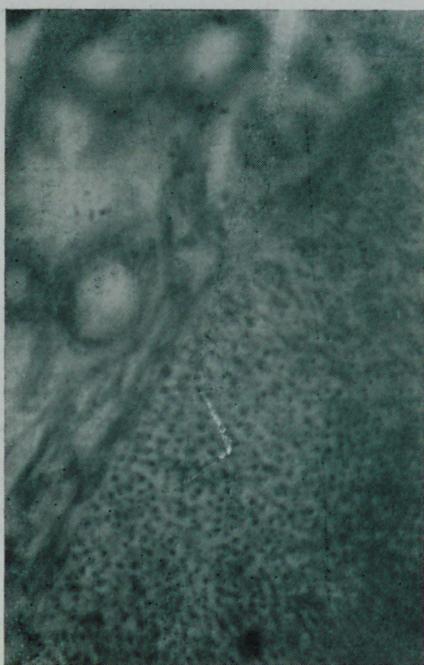
C



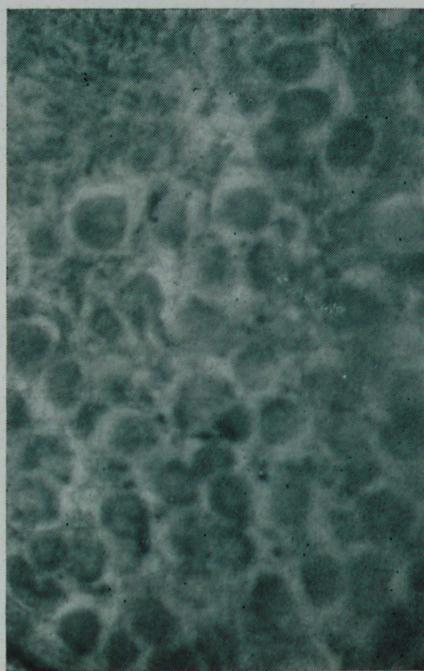
Em C — Tecido ósseo.
Aumento 45 x
Método de Bielschowsky modificado.

FIG. N.º 11

Gato adulto: secção longitudinal da cóclea.



A

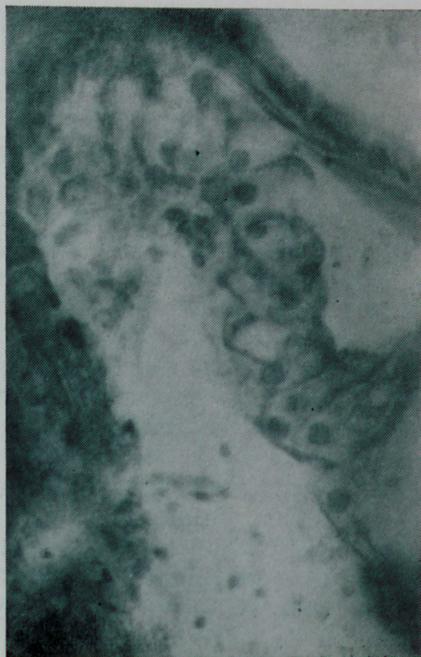


B

Em A — Fibras do nervo coclear em secção transversal.
Em B — Células do gânglio de Corti e anficitas.
Aumento 45 x
Método de Bielschowsky-Hortega.

FIG. N.º 12

Gato adulto: secção longitudinal da cóclea.



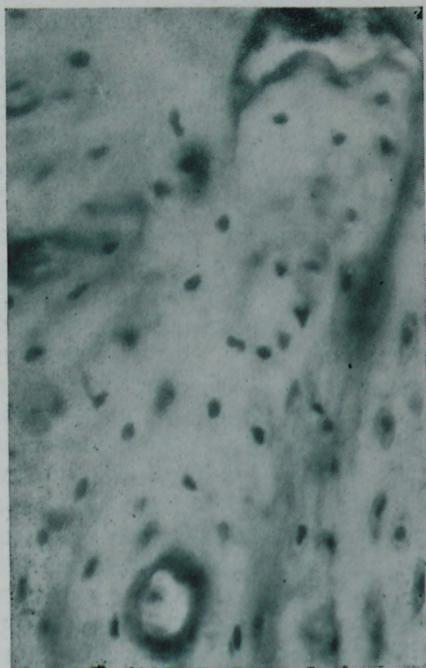
A



B

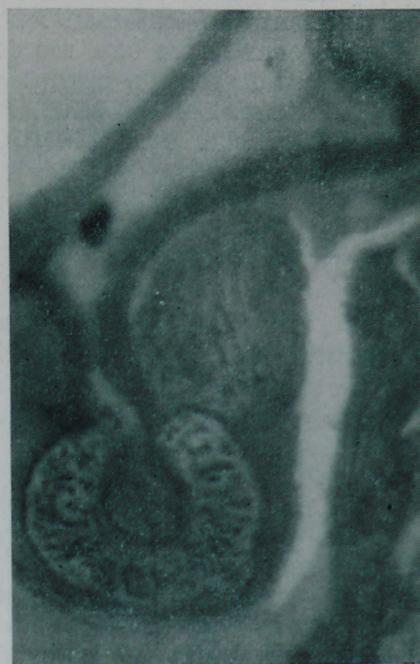
Em A — Células acústicas externas e internas.

Em B — Membrana de Reissner.



C

Em C — Tecido ósseo.



D

Em D — Tuba auditiva cartilaginosa em secção transversal.

Aumento 45 x
Método de Bielschowsky-Hortega.