

COLORAÇÃO DE FIBRAS DE RETICULINA EM MATERIAL CALCIFICADO

Hardy Ebling (*)

Introdução

A impregnação de peças calcificadas para a demonstração de fibras de reticulina pode se constituir num problema difícil para o principiante. Para determinar o método de resultados mais seguros, usamos os seguintes:

Maresch-Bielschowsky (1), Perdrau (2), Foot (3), Foot (4), Laidlaw (5), Masson (6), Wilder (7), Gomori (8), Lillie (9) e Bielschowsky-Foot (10).

O material usado foi: dentes humanos hígidos, mandíbula de cão, cabeça de rato de 20 dias «in utero», cabeça de gato recém nascido e mandíbula de peixe (piava).

Apresentamos abaixo o método de Bielschowsky-Foot, com a complementação necessária para tecidos

duros e que em nossas mãos deu o melhor resultado, alguns comentários sobre a execução do método, reações e o cálculo ideal.

Fixador

Douin, dois a três dias.

Lavagem

A lavagem pode ser iniciada com água corrente, por duas horas. O passo seguinte completa a lavagem e simultaneamente descalcifica.

Descalcificação

O líquido usado por Powers (11) dá bons resultados:

;

Alcool 50% — 95 c.c.
Ácido tricloracético — 5 g.

* Catedrático de Histologia.

O tempo exigido para descalcificação varia bastante segundo vários fatores, como: tamanho da peça, quantidade de osso, cartilagem, dentina, esmalte, cimento, quantidade de líquido descalcificador, número de mudanças, temperatura ambiente, etc.

Como exemplos:

Embrião inteiro de rato com 20 dias «in utero», cinco dias, com 100 c.c. de líquido descalcificador.

Dente humano completamente desenvolvido, cerca de 27 dias, com mudança semanal do líquido, 100 c.c. de cada vez. Depois de 15 dias no descalcificador é interessante retirar um pouco de dentina. Isto apressa a descalcificação e permite orientar melhor a peça.

Cabeça de gato recém nascido, oito dias, com uma mudança no quarto dia, 100 c.c. de líquido descalcificador.

Lavagem

Lavar a peça em água corrente durante duas horas.

Desidratação, clarificação e inclusão

Desidratar em álcool 50, 60, 70, 80 e 90, 24 horas em cada.

Para peças de mais de um cm. de espessura, a desidratação no álcool 80 e 90 deve ser de 48 horas. A seguir usa-se uma mistura em partes iguais de álcool 95 e álcool n-butílico, durante 48 horas. Finalmente, álcool n-butílico, por 48 horas.

Parafina. Três banhos de oito a doze horas cada.

Nota: As parafinas do banho 1 e 2, não devem ser reaproveitadas, pois o álcool n-butílico que permanece altera suas propriedades, dificultando o corte.

Córtex

De 6 a 9 micra.

Soluções

A solução de prata amoniacal é feita da maneira seguinte: A 20 c.c. de solução de nitrato de prata a 10% adicione 20 gotas de solução de hidróxido de sódio a 40%. Dissolva o precipitado resultante com cerca de 2 c.c. de água amoniacal forte, adicionada gota a gota, até restar apenas poucas partículas. É melhor filtrar alguns granulos do que adicionar muita amonia. Leva-se a solução resultante a 80 c.c. com água destilada e filtra-se antes de usar. A solução deve ser preparada no ato e em vidraria livre de ácidos.

Nota: A amonia brasileira (Amonia Líquida 24° Bê, Usina Colombina S. A.) dá bons resultados, porém deve usar-se cerca de 3,5 c.c. para conseguir a quase total redissolução do precipitado.

Solução de Permanganato de Potássio.

Permanganato de Potássio — 0,25 g.
Água destilada — 100,00 c.c.

Solução de Ácido Oxálico

Ácido Oxálico — 5,0 g.
Água Distilada — 100,0 c.c.

Solução de Nitrato de Prata

Nitrato de Prata, P. A. — 2,0 g
Água distilada — 100,0 c.c.

Solução de Formalina

Formol neutro, 37-40% — 5,0 c.c.
Água Distilada — 95,0 c.c.

Solução de Cloreto de Ouro

Solução de cloreto de Ouro a 1%
— 1,0 c.c.
Água distilada — 99,0 c.c.

Solução de Tiosulfato de Sódio

Tiosulfato de Sódio — 5,0 g.
Água Distilada — 100,0 c.c.

Procedimento para a impregnação

1. Xilol, alcool absoluto, alcool 95%. Nesta altura é prudente mergulhar os cortes em colódio a 1/1000., por um minuto, deixa secar 1 minuto, passando a seguir para o alcool a 80% durante um minuto. Lavar. (°)
2. Mergulhe em água distilada.
3. Solução de Permanganato de Potássio, 5 minutos.
4. Lave bem em água corrente.
5. Solução de ácido Oxálico, até as secções perderem a colo-

ração do Permanganato de Potássio. (cêrca de dois minutos).

6. Lave bem em água corrente e água distilada.
7. Coloque as lâminas na solução a 2% de Nitrato de Prata, por 48 horas, em luz difusa. (a cubeta de coloração pode ser coberta com plástico incolor).
8. Lave em água distilada. (mergulhe em três frascos, 15 segundos em cada). Esta água distilada deve ser desprezada e os frascos não devem ser usados mais no decorrer desta mesma coloração).
9. Mergulhe as lâminas na solução de Prata Amoniacal, durante 30 minutos.
10. Mergulhe muito rapidamente em água distilada. (De preferência empregue duas).
11. Reduza em formol neutro a 5%, durante 30 minutos. (A redução dá-se em poucos minutos).
12. Mergulhe em água corrente.
13. Córe com solução aquosa de Cloreto de Ouro, durante uma hora. Controle ao microscópio.
14. Lave em água corrente.
15. Fixe na solução de tiosulfato de sódio por 2 minutos.
16. Lave bem em água corrente.
17. Mergulhe em água distilada.
18. Alcool 95%.

(°) Para embriões é recomendável usar uma solução saturada de ácido picrico, si o material foi fixado no formol. Esta solução (duas horas) remove o pigmento de formol que comumente se forma neste material, quando fixado em formol, ou solução que o contenha.

19. Alcool 100, duas mudanças.
 20. Xilol, três mudanças.
 21. Monte em bálsamo.

$$1 \text{ ml KOH (40\%)} = 0,4 \text{ g KOH}$$

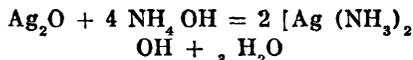
$$0,4 \text{ — } 1 \text{ ml}$$

$$0,33 \text{ — } x$$

Teoria da Impregnação

O mecanismo exato pelo qual dá-se a impregnação é desconhecido. Mas pode-se estudar as reações entre os diversos reativos e fazer o cálculo da quantidade ideal necessária.

O primeiro passo é traduzido pela seguinte reação:



Cálculo

Quanto ml ou g de KOH (40%) são necessários para precipitar 10 ml de AgNO_3 (10%)

Pêso molecular $\text{AgNO}_3 = 169,9 \text{ g}$.
 Pêso molecular $\text{KOH} = 56,11 \text{ g}$.

AgNO_3 (10%) = 10g em 100 ml
 em 10 ml = 1 g AgNO_3
 KOH (40%) = 40g KOH em 100ml
 $2\text{AgNO}_3 + 2\text{KOH} = \text{Ag}_2\text{O}$
 $2x \ 169,9 \text{ — } 2x56,11 = 231,76$
 $339,8 \text{ — } 112,22 = 231,76 + \dots$
 1 — x

$X = \text{g KOH p.pptar } 10 \text{ ml } \text{AgNO}_3$
 (10%)

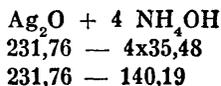
$x = 0,33 \text{ g KOH}$

ou

$$X = \frac{0,33}{0,4}$$

$X = 0,83 \text{ ml KOH (40\%)}$

Quantidade de amônia para dissolver o precipitado de Ag_2O .



No nosso caso:

1 g AgNO_3 (10ml) — 0,33g (KOH)
 dando $\rightarrow 0,68 \text{ g Ag}_2\text{O}$
 Para 231,76 de Ag_2O — 140,19
 NH_4OH conc. 0,68 (result. dos 10 ml) — x
 $x = 0,41 \text{ g de NH}_4\text{OH}$

Como o NH_4OH conc. é uma sol. que contém 28% NH_3 , temos que fazer o seguinte cálculo

$$100 \text{ — } 28$$

$$X \text{ — } 0,41$$

$$X = 1,46 \text{ g NH}_4\text{OH}$$

ou

$$M = Vd$$

$$V = \frac{M}{d}$$

$$V = \frac{1,46}{0,90 \text{ (de NH}_4\text{OH)}}$$

$V = 1,62 \text{ ml}$.

**Cuidados necessários para obter
uma bôa impregnação.**

1. Os frascos, pipetas, etc., devem ser rotulados. Isto permite usar indefinidamente a vidraria, desde que seja feita uma perfeita lavagem logo após o seu uso, e que a vidraria seja usada sempre para o mesmo reativo.

RESULTADOS.

Reticulina: violeta-negro a negro.

Osso: cobre a cobre-escuro.

Dentina: amarelo-escuro.

Agradecimento.

Agradeço ao Dr. Aron Kac a gentileza de fotografar as preparações.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Bielschowsky, M., Maresch, R.: Zentralbl. f. allg. Path. u. path. Anat., 16: 641, 1905.
- 2) Perdrau, J.R.: J. Path. & Bact., 24: 117, 1921.
- 3) Foot, N.C., J. Lab. & Clin. Med., 9: 778, 1924.
- 4) Foot, N.C., Menard, M.C.: Arch. Path., 4: 211, 1927.
- 5) Laidlaw, G.F.: Am. J. Path., 5: 239, 1929.
- 6) Masson, P.J.: J. Tech. Methods, 12: 75, 1929.
- 7) Wilder, H.C.: Am. J. Path., 11: 817, 1935.
- 8) Gomori, G.L.: Am. J. Path., 13: 993, 1937.
- 9) Lillie, R.D.: Stain Tecn., 21: 69, 1946.
- 10) Manual of Histologic and Special Staining Tecnic, Armed Forces Institute of Pathology, Washington, D.C., 1957.
- 11) Powers, M.M.: J.D. Res., 31: 383, 1952.

.
:
.
:
.
:
.

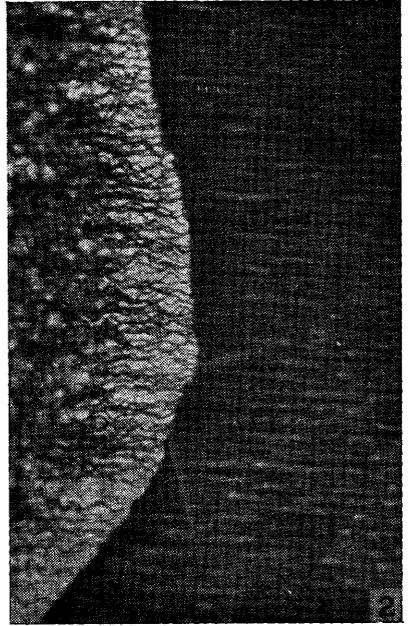
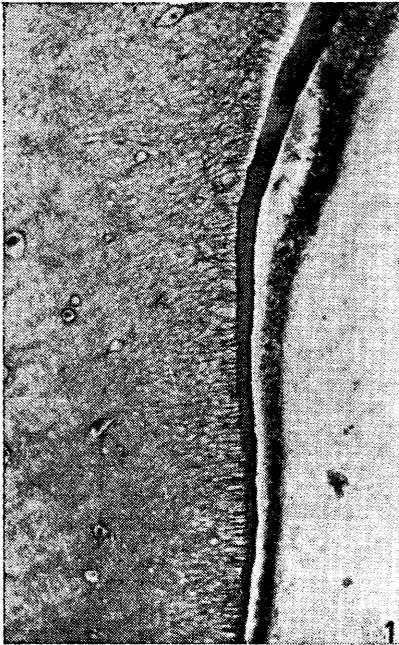


Fig. 1 Aumento aproximado 100 diámetros.
Fibras de von Kóff. Germen dentário de gato (molar).

Fig. 2 Aumento aproximado 430 diámetros.
Fibras de von Kóff. Molar humano.

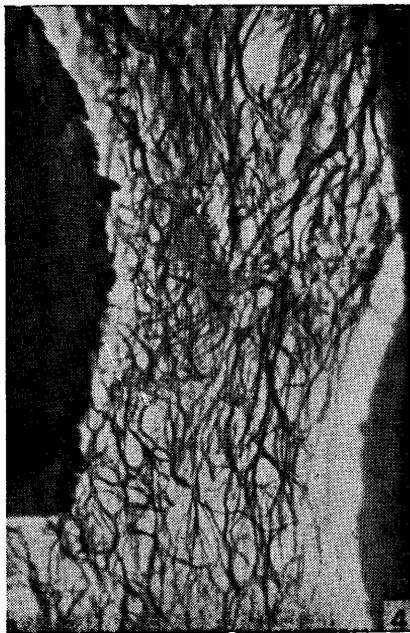
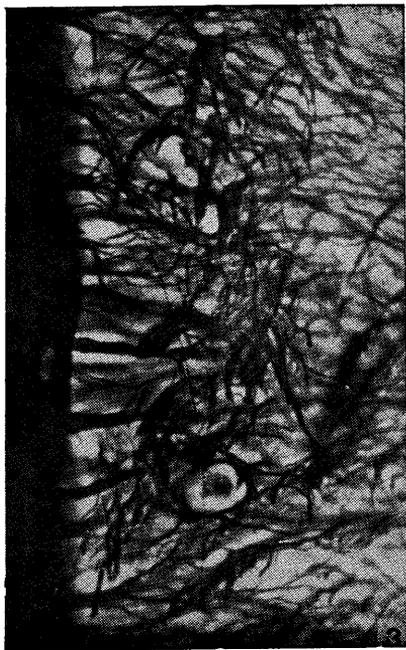


Fig. 3 Aumento aproximado 430 diâmetros.
Fibras colagenas inserindo-se (ângulo reto) no osso alveolar.
Fibras de reticulina em variadas direções. Mandíbula de Piava.

Fig. 4 Aumento aproximado 430 diâmetros.
Fibras de reticulina num canal de Havers. Mandíbula de Piava.